

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ALFREDO WALTER

**ESTUDO DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO
DE FICOCIANINA A PARTIR DA MICROALGA *Spirulina platensis* SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

CURITIBA
2011

ALFREDO WALTER

**ESTUDO DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO
DE FICOCIANINA A PARTIR DA MICROALGA *Spirulina platensis* SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

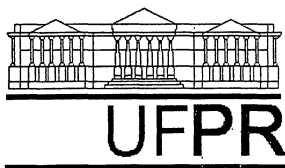
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2011



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos


Aos trinta dias do mês de setembro de 2011, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Quinquagésima Sexta Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

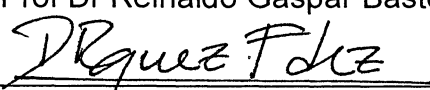
A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos membros Prof Dr Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar), Profª Drª Ligia Alves da Costa Cardoso (UP), Dr. Daniel Ernesto Rodriguez Fernandez (UFPR) e Prof Dr Julio César de Carvalho (UFPR - orientador da dissertação).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Alfredo Walter** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: **“Estudo do Processo Biotecnológico para Obtenção de Ficocianina a partir da Microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

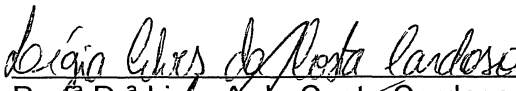
Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof Dr Reinaldo Gaspar Bastos, Profª Drª Ligia Alves da Costa Cardoso, Dr. Daniel Ernesto Rodriguez Fernandez, e Prof Dr Julio César de Carvalho declarou o candidato APROVADO (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

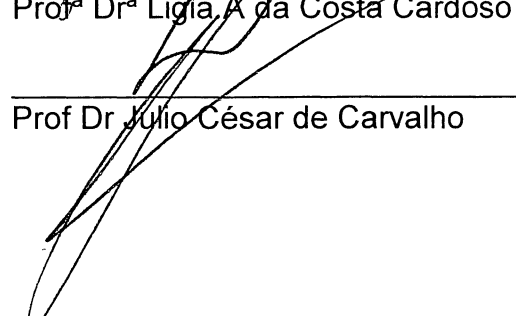
Curitiba, 30 de Setembro de 2011.



Prof Dr Reinaldo Gaspar Bastos


Dr. Daniel E Rodriguez Fernandez,



Profª Drª Ligia A da Costa Cardoso


Prof Dr Julio César de Carvalho

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Júlio César de Carvalho, pela excelente orientação, profissionalismo e todo conhecimento transmitido.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da UFPR, professora Dr^a. Luciana Vanderberghe e Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade, acolhida e presteza.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da UFPR, às queridas Mitiyo, Celina e às professoras Dr^a. Ana Lúcia Porto e Dr^a. Tatiana Souza Porto, da UFRPE.

À minha querida estagiária e bolsista de Iniciação Científica Ana Bárbara Faria, por seu brilhantismo e capacidade de realização e à Bruna Raddatz, também bolsista e que apesar do pouco tempo que trabalhamos juntos, já demonstrou toda sua competência e profissionalismo.

A todos os colegas de pós-graduação e amigos de Baygon: Siliane Berté, Denise Salmon, Felipe Brisk, Carolina Perottoni, Sidnei Bordignon, Carlos Sanchuki, Giovana Boff, Jeferson Costa, Vanessa Ghiggi, Joana Rizzolo, Gisele Matos, Mário Bier, Caroline Yamaguishi, Júlio Frison, Gerson, Pamela Harada, Fernanda Vasconcelos, Ju Oliveira, Ju Oss, Cris, Andrea Arakaki, Ale, Sidnei, Gustavo, Fábio, Renato, Luíza, Paloma, Sasha Habu, Sandra Angelis, Susan, Valesca, Maria Rosa, Luiz Gustavo, Carol Chelly, Daniel Fernandez e Bruno Da´Campo.

Aos mais do que especiais Ro, Italo, Leo e Xyca pela compreensão e orientação nessa caminhada e à minha família pelo incentivo incondicional.

Ao Estado Brasileiro e a CAPES, que, apesar do atraso, tem investido cada vez mais em educação, viabilizando a pesquisa e a qualificação da educação nacional.

O universo conspira em favor de quem é do bem.

RESUMO

Algumas espécies de microalgas, como a cianobactéria *Spirulina platensis* destacam-se por apresentarem biomassa rica em compostos nutricionais e pigmentos naturais, como as ficobiliproteínas, os carotenóides e as clorofilas. Dentre as ficobiliproteínas derivadas da *Spirulina*, a mais abundante é a ficocianina, um pigmento de coloração azul brilhante que, dependendo da sua pureza, encontra diferentes e importantes aplicações. Considerando que as condições de cultivo podem influenciar decisivamente as fases de crescimento da *Spirulina*, aumentando ou reduzindo a quantidade de ficocianina obtida, foi investigado o fenômeno da adaptação cromática complementar e sua influência na obtenção de ficocianina. Isso foi realizado ao submeter os cultivos de *Spirulina platensis*, cepas PAR e LEB-52 a diferentes espectros luminosos e analisando a concentração de biomassa, ficocianina e o seu grau de pureza, demonstrando que pode haver uma reestruturação dos ficobilissomos, especialmente quando a cultura é submetida à luz vermelha, o que pode incrementar o nível de pureza em até 33%, com uma redução de apenas 16% do conteúdo de ficocianina e com uma alta eficiência fotossintética quando comparada com a cultura sob luz natural. Testes de cultivo da *Spirulina platensis* e também com *Chlorella vulgaris* também foram realizados em meios de cultivo alternativos, baseados em resíduos agroindustriais como efluente primário de pocilgas, efluente terciário de indústria processadora de produtos cárneos e manipueira. Os resultados demonstraram que a manipueira demonstra grande potencial tanto para o cultivo da *Spirulina platensis*, assim como a *Chlorella vulgaris*. A produção de ficocianina foi possível quando a *Spirulina* foi cultivada em manipueira, o que representa uma excelente possibilidade de aproveitamento para esse resíduo, visto que atualmente ele é, na maioria dos casos, despejado sem qualquer tratamento em corpos d'água e no solo. O Sistema de Extração em Duas Fases Aquosas (SDFA) também foi testado como uma etapa de purificação da ficocianina, atingindo um fator de purificação de 2,67 para a ficocianina e a aplicação da ficocianina purificada e diluída, em amostras de alimentos funcionais (leite fermentado) também foi realizada com êxito. Finalmente, os testes com diferentes técnicas de preservação e criopreservação possibilitaram identificar qual seria a melhor para a preservação da *Spirulina platensis* por longos períodos, garantindo sua viabilidade e produção rápida de inóculo.

Palavras chave: *Spirulina platensis*, adaptação cromática, manipueira, purificação, criopreservação.

ABSTRACT

Some species of microalgae, such as the cyanobacterium *Spirulina platensis* stand out by presenting biomass rich in nutritional compounds and natural pigments, such as phycobiliproteins, carotenoids and chlorophylls. Among phycobiliproteins of *Spirulina*, the more abundant is phycocyanin, a bright blue pigment which, depending on its purity, will find different and important applications. Considering that culturing conditions may influence strongly the stages of *Spirulina* growing, increasing or reducing the amount of phycocyanin obtained, we investigated the phenomenon of complementary chromatic adaptation and its influence on phycocyanin obtainment. It was made by subjecting cultures of *Spirulina platensis*, strains PAR and LEB-52 under different light spectra, analyzing biomass concentration, amount of phycocyanin and its purity, demonstrating that there may be a restructuring of its phycobilisomes, especially when the culture is subjected to red light, which can increase the purity level up to 33%, with only 16% reduction on phycocyanin content, and with high photosynthetic efficiency when compared with cultures grown under natural light. Cultivation tests of *Spirulina platensis* and also *Chlorella vulgaris* were done in alternative culture media based on agro-industrial wastes such as pig manure, tertiary effluent from processing meat industry, and manipueira (a cassava processing residue). The results showed that manipueira has an important potential both for *Spirulina platensis*, as well as *Chlorella vulgaris* culturing. Phycocyanin production was possible when *Spirulina* was cultivated in manipueira, which represents an excellent possibility for application of this waste, contrary to what happen in most cases, when manipueira is dumped without further treatment in water bodies and soil. An extraction using Aqueous Two-Phase System (ATPS) was also tested as a purification step of phycocyanin, achieving a purification factor of 2.67 fold and application of purified and diluted phycocyanin solution in functional food samples (fermented milk) was also successful. Finally, tests with different preservation and cryopreservation techniques allowed to identify which would be the best way for *Spirulina platensis* preservation for long periods, ensuring its viability and fast inoculum development.

Key words: *Spirulina platensis*, chromatic adaptation, manipueira, purification, cryopreservation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivo geral	14
1.2	Objetivos Específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Algas – Visão Geral	16
2.1.1	Meios de cultivo e nutrição	20
2.1.2	Tecnologia de cultivo das microalgas.....	22
2.1.3	Seleção de cepas e bancos de linhagens.....	29
2.1.4	Microalgas: seus produtos e aplicações.....	30
2.2	Micro-organismo de interesse: <i>Spirulina</i>	47
2.2.1	Aspectos históricos e ocorrência natural.....	47
2.2.2	Caracterização e morfologia da <i>Spirulina</i>	48
2.2.3	Técnicas de cultivo.....	50
2.3	Técnicas de preservação das cepas de interesse	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	Micro-organismos.....	56
3.2	Meios de Cultivo.....	56
3.3	Condições de cultivo	58
3.4	Métodos Analíticos.....	62
3.4.1	Extração do pigmento	63
3.4.2	Purificação do pigmento	64
3.4.3	Ensaio de criopreservação	67
3.4.4	Ensaio de conservação da ficocianina em alimentos.....	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	Cinéticas de crescimento nos diferentes meios e condições de cultivo e sua relação com a obtenção da ficocianina	71
4.2	Recuperação da biomassa e extração da ficocianina.....	100
4.3	Purificação da ficocianina	103
4.4	Preservação das cepas de interesse	111
4.5	Ensaio de conservação da ficocianina em alimentos.....	116
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	119
5.1	Conclusões.....	119
5.1.1	O fenômeno da adaptação cromática complementar ocorre na <i>Spirulina platensis</i>	119
5.1.2	A utilização de águas residuárias (efluente líquido) como meio de cultivo alternativo para a produção de biomassa de <i>Spirulina platensis</i> é possível sob determinadas condições.....	119
5.1.3	A manipueira demonstra grande potencial para o cultivo de <i>Spirulina platensis</i>	120
5.1.4	O SDFA pode ser empregado como uma segunda etapa de purificação da ficocianina.....	120

5.1.5	É possível criopreservar a <i>Spirulina platensis</i> por longos períodos, garantindo a sua viabilidade.	121
5.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	122
6	REFERÊNCIAS.....	123

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sistema de cultivo em circuito (raceway).	23
Figura 2 – Sistema de crescimento tubular de alta densidade	25
Figura 3 – Representação esquemática de um fotobioreator espiralado (A), uma coluna tubular inclinada (B) e um fotobioreator de placas planas vertical (C).	25
Figura 4 – Representação da profundidade com que as diferentes cores da luz penetra nas águas dos oceanos.	27
Figura 5 – Micrografia eletrônica de uma cianobactéria (<i>Synechocystis</i>) e seus ficobilissomos (A). Representação de um ficobilissomo da cianobactéria <i>Synechocystis</i> 6701 (B).	37
Figura 6 – Espectro de absorção das clorofilas e demais pigmentos.	38
Figura 7 – Representação do processo de aclimação cromática complementar da cianobactéria do gênero <i>Synechococcus</i> .	39
Figura 8 – Fórmula estrutural do pigmento ficocianina.	42
Figura 9 – Ficocianina, após processo de purificação (A) e sua fluorescência característica (B).	43
Figura 10 – Produção de <i>Spirulina platensis</i> em larga escala na cidade indiana de Madurai.	46
Figura 11 – Imagem da <i>Spirulina platensis</i> obtida por microscopia eletrônica.	49
Figura 12 – Aspecto dos fotobioreatores em ambiente externo, cobertos com filme colorido.	59
Figura 13 – Fluxograma da técnica de preservação utilizada.	69
Figura 14 – Cinética de crescimento de duas cepas de <i>Spirulina</i> sob as mesmas condições de cultivo.	72
Figura 15 – Gráficos com a velocidade específica de crescimento μ (d^{-1})	73
Figura 16 – Logaritmo da concentração de biomassa (X) em função do tempo (dias).	74
Figura 17 – Ponto de inflexão (X''), obtido no 18º dia de cultivo.	75
Figura 18 – Espectro de absorção da <i>Spirulina platensis</i> (cepas LEB-52 e PAR), em meio Zarrouk.	76
Figura 19 – Biomassa (X, em $g \cdot L^{-1}$) produzida no período de cultivo.	77
Figura 20 - Quantidade de ficocianina obtida (em $mg \cdot g^{-1}$ de biomassa seca), no mesmo período de cultivo da Figura 19.	78
Figura 21 – Concentração de biomassa (X) em função do tempo (dias).	79
Figura 22 – Concentração de biomassa ($g \cdot L^{-1}$) em função do tempo (dias).	80
Figura 23 – Concentração de biomassa ($g \cdot L^{-1}$) nos cinco fotobioreatores em função do tempo (dias).	82

Figura 24 – Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nos cinco fotobioreatores em função do tempo (dias).	83
Figura 25 – Espectro de absorção dos diferentes filtros utilizados, comparados com o espectro da <i>Spirulina platensis</i>	84
Figura 26 – Simulação do fenômeno do processo de aclimação cromática complementar constatado nos cultivos de <i>Spirulina platensis</i>	86
Figura 27 – Comparativo do crescimento de culturas inoculadas em diferentes diluições de efluente primário de suínos.	87
Figura 28 – Comparativo obtido através da medida de absorbância a 670 nm.	88
Figura 29 – Alterações morfológicas visíveis nos cultivos realizados em efluente.	89
Figura 30 – Alterações morfológicas na <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 submetida a diferentes meios de cultivo e observada em microscópio com aumento de 40 vezes.	91
Figura 31 – Aspecto final dos cultivos preliminares em manipueira.	93
Figura 32 – Relação entre a produtividade e a quantidade de ficocianina obtida.	94
Figura 33 – Relação entre a leitura da absorbância, concentração da biomassa e produtividade no cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em manipueira – cinética 09.	96
Figura 34 – Gráfico com o ponto de inflexão da <i>Chlorella vulgaris</i> em manipueira – Cinética 09.	96
Figura 35 – Relação entre a leitura da absorbância, concentração da biomassa, produtividade e obtenção de ficocianina ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) no cultivo da <i>Spirulina platensis</i> PAR em manipueira não esterilizada – Cinética 10.	98
Figura 36 – Relação entre a leitura da absorbância, concentração da biomassa e produtividade no cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em manipueira não esterilizada – Cinética 11.	99
Figura 37 – Aspecto da manipueira <i>in natura</i> e após filtração ou decantação por 6 horas	99
Figura 38 – <i>Pellet</i> de biomassa, após centrifugação e secagem.	100
Figura 39 – Relação dano celular x pressão aplicada e o comparativo com método padrão. ...	102
Figura 40 – Característica do rompimento celular.	103
Figura 41 – Amostra padronizada e as fases formadas no planejamento.	105
Figura 42 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição k_p e o efeito estimado (valor absoluto) na abscissa.	107
Figura 43 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da ficocianina (FC) e o efeito estimado (valor absoluto) na abscissa.	108

Figura 44 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta a recuperação de ficocianina para analisar o pH em função da massa molar do PEG (MPEG).	109
Figura 45 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o fator de purificação de ficocianina (FC) e o efeito estimado (valor absoluto) na abscissa. .	109
Figura 46 – Cubo com correlação entre as principais variáveis para a melhor resposta de fator de purificação da ficocianina.	110
Figura 47 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta o fator de purificação de ficocianina para analisar o pH em função da massa molar do PEG (M_{PEG}).	111
Figura 48 – Presença de tricomas da <i>Spirulina platensis</i> após a etapa de criopreservação.	112
Figura 49 – Ausência de tricomas da <i>Spirulina platensis</i> após a etapa de criopreservação.	112
Figura 50 – Gráfico comparativo entre três diferentes métodos para acompanhamento do crescimento celular do cultivo de controle: absorvância, gravimetria (biomassa seca) e contagem de células.	113
Figura 51 – Aspecto final das amostras de leite fermentado sabor natural contendo probióticos do gênero <i>Bifidobacterium</i>	116
Figura 52 – Amostras com leite fermentado sabor natural, parcialmente desnatado, contendo probióticos do gênero <i>Lactobacillus</i>	116
Figura 53 – Acompanhamento da degradação da ficocianina pela leitura da absorvância nas amostras de bebida láctea com <i>Bifidobacterium</i> (LFB) e <i>Lactobacillus</i> (LFL).	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema de classificação dos diferentes grupos algais.	17
Tabela 2 – Composição genérica de diferentes alimentos humanos e algas (base % de matéria seca)	18
Tabela 3 – Comparação da velocidade específica máxima de crescimento de algumas microalgas cultivadas em meio fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico.	21
Tabela 4 – Produtos, aplicações e valor de mercado.	32
Tabela 5 – Pigmentos encontrados nas diferentes divisões de algas.	40
Tabela 6 – Pigmentos ou associação de pigmentos obtidos das microalgas, valor comercial e aplicações.	41
Tabela 7 – Composição do meio Zarrouk.	51
Tabela 8 – Composição do efluente sintético de suínos.	53
Tabela 9 – Planejamento fatorial 2^4 com as condições definidas para o estudo de purificação através do SDFA.	65
Tabela 10 – Relação entre os sais de fosfato utilizados para uma solução 40% (m/m).	66
Tabela 11 – Rendimento da extração (em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 01.	75
Tabela 12– Biomassa (X) e produtividade (P) obtida nos fotobioreatores da cinética 03.	79
Tabela 13 – Rendimento da extração (em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 03.	80
Tabela 14 – Biomassa (X) e produtividade (P) obtida nos fotobioreatores da Cinética 04.	81
Tabela 15 – Biomassa (X) e produtividade (P) obtida nos fotobioreatores da Cinética 05.	82
Tabela 16 – Rendimento da extração (em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 05.	83
Tabela 17 - Comparação da produtividade (biomassa) obtida até o 18º dia de cultivo sob os diferentes filtros.	84
Tabela 18 – Rendimento da extração (ficocianina em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 06.	89
Tabela 19 – desenvolvimento da biomassa e produtividade da <i>Spirulina platensis</i> LEB-52.	90
Tabela 20 – Produção de ficocianina, aloficocianina e grau de pureza obtidos – Cinética 07.	91
Tabela 21 – Desenvolvimento da biomassa e produtividade da <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada sob adição gradual de manipueira – cinética 09.	95

Tabela 22 – resumo dos resultados obtidos: volume formado nas fases, concentração de proteínas em cada fase e fator de purificação da aloficocianina (AFC) e da ficocianina (FC) obtidos sobre o extrato inicial.	106
Tabela 23 – Comparativo entre os três métodos de acompanhamento do crescimento celular nas diferentes condições.....	114

1 INTRODUÇÃO

As algas podem ser encontradas em quase todos os ambientes da Terra, vivendo de forma isolada ou associada a outros organismos, como fungos e bactérias. Na maioria desses ambientes, seu papel é de produtor primário na cadeia alimentar, produzindo matéria orgânica a partir da luz solar, dióxido de carbono e água. A biomassa microalgal possui diversas aplicações, dentre elas a produção de biocombustíveis, alimentação, produção de cosméticos, medicamentos, dentre outras. Por um longo período, as algas foram colhidas de fontes naturais para o consumo de humanos e animais (LEE, 1989 e GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

A idéia de produção em massa de microalgas com fins industriais foi pleiteada por dois cientistas alemães (R. Harder e H. Von Witsh), que em 1942 demonstraram a possibilidade de produzir lipídios mediante o cultivo de diatomáceas sob determinadas condições nutricionais. Já no princípio dos anos 50, o interesse pela pesquisa com as microalgas ganhou impulso contínuo. Durante essa época, cientistas americanos demonstraram como a composição química da *Chlorella*, principalmente em seu conteúdo lipídico e protéico, poderia ser manipulada ao se variarem as condições de crescimento, mas foram os japoneses os primeiros a iniciar o cultivo de microalgas em nível industrial e comercializar *Chlorella* como alimento funcional e na forma de um extrato solúvel em água.

Algumas espécies de microalgas, como a *Spirulina*, destacam-se nesse contexto, principalmente por apresentarem biomassa com composição bioquímica diversificada: compostos nutricionais e pigmentos naturais com propriedades funcionais, como as ficobilinas, carotenóides e clorofilas. Dentre as ficobilinas obtidas a partir da *Spirulina*, uma das mais abundantes é a ficocianina, um pigmento que apresenta coloração azul brilhante que, dependendo do seu grau de pureza, encontra diferentes e importantes aplicações.

Além de características altamente favoráveis como a possibilidade de cultivo contínuo e a rápida multiplicação dessas microalgas sob condições de baixo custo, o mercado encontra-se em expansão, uma vez que a cor representa aspecto fundamental na aceitação de determinados produtos e a tendência é de substituição dos corantes sintéticos por pigmentos naturais, especialmente de fontes não vegetais (SILVA, 2008).

Aliado ao aspecto comercial, outro fator desencadeador de novas oportunidades relaciona-se com a temática ambiental, visto que algumas espécies de microalgas também apresentam ótimos resultados no contexto da mitigação das emissões de gases do efeito estufa e na complementação de sistemas de tratamento de efluentes já existentes (CAMERINI, 2008).

O valor comercial da ficocianina está diretamente relacionado ao seu grau de pureza, que pode variar entre um índice mínimo para ser considerado *food grade* (valor aproximado de US\$ 0,13 mg⁻¹) até o índice máximo de pureza (produto considerado de grau analítico), onde o produto pode ser vendido por até US\$ 25 mg⁻¹. Isso demonstra que se considerarmos as diversas operações unitárias envolvidas especialmente no processo de extração e purificação da ficocianina, o produto possuirá elevado custo comercial e consequentemente, sua ampla utilização pode ser dificultada. Entretanto, se determinadas etapas tiverem seu custo reduzido, este cenário pode ser modificado, o que favoreceria uma aplicação mais ampla da ficocianina. Os dois caminhos para realizar essa redução de custo são a produção de biomassa (cultivo) e o desenvolvimento de alternativas de baixo custo no processamento.

Muitos melhoramentos fisiológicos e principalmente tecnológicos foram investigados e propostos com o objetivo de maximizar a produtividade de sistemas de cultura algal. Os testes mais recentes tem como alvo o desempenho dos cultivos em campo, visando determinar os gargalos que prejudicam a produtividade de culturas ao ar livre, que ainda não é satisfatória.

Como alguns autores relatam, as condições de cultivo podem influenciar decisivamente as fases de crescimento da *Spirulina*, provocando alterações na composição bioquímica de sua biomassa – aumentando ou diminuindo a proporção das ficobiliproteínas de interesse, neste caso, a ficocianina. É oportuno desenvolver sistemas mais eficazes, presumindo-se métodos de cultivo que permitam a melhor utilização dos substratos e energia disponíveis, buscando-se ainda, melhores padrões de qualidade e rendimento do produto.

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é o estudo do processo biotecnológico para produção de biomassa e extração da ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo.

1.2 Objetivos específicos

- Realizar levantamento bibliográfico das informações que fundamentam esta pesquisa;
- Submeter as culturas de *Spirulina platensis* a diferentes condições de iluminação, analisando sua relação com a produção de ficocianina;
- Considerando os aspectos relacionados com a melhoria das condições ambientais e a complementação de sistemas de tratamento de efluentes (líquidos ou gasosos), estudar a utilização de águas residuárias (efluentes líquidos) como meio de cultivo alternativo para a microalga *Spirulina platensis*, bem como sua relação com o rendimento e a qualidade da ficocianina, se obtida;
- Avaliar a produtividade em biomassa de *Spirulina platensis*, cultivada em águas residuárias, comparando-a com outra espécie de microalga, a *Chlorella vulgaris*;
- Estudar duas técnicas de purificação da ficocianina em termos de produtividade e sua aplicabilidade;
- Testar técnicas de preservação e criopreservação das cepas de interesse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Algas – Visão Geral

As algas podem ser encontradas em praticamente qualquer lugar: desde fontes de água doce até lagos salgados, com tolerância a uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez, concentrações de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂). Podem ser planctônicas como a maioria das espécies unicelulares, vivendo suspensas em regiões iluminadas dos mais diversos corpos d'água, inclusive sob o gelo polar ou aderidas a superfícies e outros sedimentos (LEE, 1989; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

A estimativa de espécies de algas existentes varia de um a dez milhões, sendo as microalgas a maioria. Apesar da grande variedade, é muito provável que a dificuldade em coletar esses organismos tão pequenos, justifique sua incorporação tardia ao consumo humano. Os oceanos, que cobrem cerca de 70% da superfície da Terra, contêm mais de cinco mil espécies de algas planctônicas microscópicas (o *fitoplâncton*), que por sua vez compõe a base da cadeia alimentar marinha. Apesar dessa relação com a vida, o *fitoplâncton* algumas vezes pode ser o causador de mortes: quando sua população torna-se muito grande, num fenômeno conhecido como *bloom* e que ocorre graças à poluição (desequilíbrio causado excesso de nutrientes como nitrogênio e fosfato em seu habitat), a transparência da água é reduzida, prejudicando outros organismos fotossintéticos ou ainda, produzindo toxinas que provocam a morte de animais marinhos e aves (LEE, 1989; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Derner (2006) descreve que apesar do termo “alga” não possuir valor taxonômico, é utilizado para englobar organismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos (inclusive as cianobactérias), os quais são capazes de realizar fotossíntese oxigênica, ou seja, fotossíntese que utiliza a água como agente redutor (produzindo oxigênio), sendo caracterizados e subdivididos através da consideração de uma série de critérios, principalmente os tipos de pigmentos, a natureza química de seus produtos de reserva, os constituintes da parede celular e a sua estrutura celular básica, cujos grupos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Esquema de classificação dos diferentes grupos algais.

Reino	Divisão	Classe
Procaryota	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Florideophyceae
	Heterokontophyta	Chrysophyceae
		Xanthophyceae
		Eustigmatophyceae
		Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
		Phaeophyceae
	Haptophyta	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dynophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta	Prasinophyceae
		Chlorophyceae
		Ulvophyceae
		Cladophorophyceae
		Bryopsidophyceae
		Zygnematophyceae
		Trentepohliophyceae
		Klebsormidiophyceae
		Charophyceae
		Dasycladophyceae

Fonte: GUALTIERI e BARSANTI, 2006; GRAHAM e WILCOX, 2000.

O interesse no estudo das microalgas é resultado da sua importância em diversas cadeias tróficas e nas inúmeras possibilidades de aplicação. Excetuando-se as produtoras de toxinas, as microalgas são capazes de incrementar o conteúdo nutricional da alimentação e influenciar positivamente a saúde de humanos e animais, graças à sua composição química (exemplificada na Tabela 2), que é rica em proteínas, grande variedade de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos saturados e insaturados, vitaminas e pigmentos (SPOLAORE *et al*, 2006).

Tabela 2 – Composição genérica de diferentes alimentos humanos e algas (base % de matéria seca)

Alimento	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
Carne	39	38	1
Leite	43	1	34
Arroz	26	38	28
Soja	8	77	2
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 – 56	25 – 30	4 – 7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 – 58	12 – 17	14 – 22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 – 39	40 – 57	9 – 14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 – 56	10 – 17	12 – 14
<i>Spirulina máxima</i>	60 – 71	13 – 16	6 – 7
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Adaptado de: SPOLAORE *et al*, 2006.

As duas classificações básicas das células - procariotes e eucariotes – encontram representantes dentre as microalgas. As células procarióticas não possuem suas organelas delimitadas por membrana e são características das divisões Cyanophyta e Prochlorophyta. As demais divisões são consideradas eucarióticas, as quais se diferenciam basicamente por possuírem organelas, membrana celular composta de polissacarídeos, membrana plasmática responsável pela entrada e saída de substâncias no protoplasma e núcleo circundando por dupla membrana porosa (LEE, 1989).

Apesar das diferenças estruturais, a maioria das algas apresentam características fisiológicas semelhantes e análogas às plantas, sintetizando e acumulando diversas substâncias em comum, porém, com vantagens sobre as plantas terrestres, dentre elas:

- muitas espécies crescem mais rapidamente, proporcionando maior produtividade;
- apresentam estrutura unicelular, o que assegura a mesma composição bioquímica, diferentemente das plantas terrestres que apresentam compostos localizados em locais específicos (somente nos frutos, nas folhas, raízes, etc.);
- a possibilidade de induzir à maior síntese ou acúmulo de compostos de interesse por meio da manipulação das condições de cultivo;
- crescem bem em regiões de extremos climáticos e até mesmo em águas residuárias (COHEN, 1986; RICHMOND, 1990; DERNER, 2006).

A classe Cyanophyceae, ou algas cianofíceas, engloba aquelas que são atualmente conhecidas como cianobactérias. Elas destacam-se pela presença do aparato bioquímico para produção de carboidratos e ATP, resultando na produção de oxigênio molecular (existem outras bactérias fotossintéticas, mas cujo metabolismo não resulta na produção de oxigênio molecular). Para realizar essa fotossíntese, cianobactérias possuem clorofila *a* (algumas também possuem clorofila *b*, *c* e *d*) e ficobiliproteínas, sendo que a ocorrência de clorofila *b* nas cianobactérias era costumeiramente usada como critério para caracterização de um subgrupo - Prochlorophyta, fato que atualmente vem caindo em desuso. (LEE, 1989; GRAHAM e WILCOX, 2000).

Algumas espécies de cianobactérias podem ser encontradas na Antártida ou nos mais quentes desertos, assim como regiões de grande altitude ou sob profundidades extremas nos oceanos, onde a fonte luminosa é azul-verde e a intensidade é apenas 0,0005% da luz medida na superfície. Nesse caso, a alga pode sobreviver no escuro azulado do oceano, pois possui pigmentos acessórios que absorvem luz em espectros diferentes da clorofila *a* e *b*, para só então transferir essa energia absorvida para a clorofila *a*, que por sua vez é capaz de converter energia solar em energia química. Por esse motivo, o verde de sua clorofila é mascarado e a alga parece bastante escura. Por outro lado, as algas que vivem em habitat sob alta irradiação solar possuem pigmentos que as protegem de danos da irradiação por si só e também da oxidação. É essa composição de arranjo de pigmentos acessórios que proporcionam às algas uma ampla variedade de cores e para alguns grupos, seus nomes usuais, tais como algas marrons, algas vermelhas, douradas e algas verdes (GRAHAM e WILCOX, 2000; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Além disso, as algas podem viver em simbiose, ou seja, quando dois ou mais organismos de diferentes espécies associam-se numa relação que proporciona benefícios recíprocos – nas seguintes configurações:

- a) associadas com fungos para formar líquens;
- b) no interior de células dos recifes de coral, fornecendo oxigênio e nutrientes complexos e recebendo em troca proteção e nutrientes simples;
- c) com bactérias, definidas em três categorias: (1) algas planctônicas associadas a células bacterianas, (2) macroalgas com bactérias e (3) algas como componentes de comunidades bentônicas altamente estruturadas;

- d) associadas com plantas, com a função básica de prover nitrogênio em troca de carbono da planta (GRAHAM e WILCOX, 2000; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

2.1.1 Meios de cultivo e nutrição

Ao todo, cerca de 99,9% da biomassa algal é composta de seis elementos principais, dentre eles o carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl), magnésio (Mg), ferro (Fe) e silício (Si). Os demais elementos são considerados elementos-traço, pois são necessários apenas para a função catalítica. Todos esses elementos incorporados à matéria orgânica são eventualmente reciclados, mas em diferentes momentos, num processo denominado mineralização. As algas, de maneira particular, são importantes para os ciclos biogeoquímicos, se considerarmos que elas captam, assimilam e produzem compostos com os elementos anteriormente mencionados (GRAHAM e WILCOX, 2000; ANDERSEN, 2005; SILVA, 2008).

As duas formas predominantes de nutrição entre as algas podem ser distinguidas entre autotrofia e heterotrofia: os organismos autotróficos são aqueles capazes de obter todos os elementos necessários ao seu crescimento apenas de fontes inorgânicas, enquanto os heterotróficos são organismos que necessitam substratos orgânicos sintetizados por outros organismos. Dentre os autotróficos há o subgrupo fotoautotrófico, com organismos que obtêm da luz a energia para seu metabolismo. A maioria dos grupos algais é considerada fotoautotrófica, isto, é, inteiramente dependentes do seu aparato fotossintético para suas necessidades metabólicas, usando a luz solar como fonte energética e dióxido de carbono (CO₂) como fonte de carbono para produção de carboidratos e ATP. De qualquer forma, é aceito que as algas usam um complexo espectro de estratégias nutricionais, combinando o fotoautotrofismo e o heterotrofismo, num sistema denominado mixotrófico (BECKER, 1994; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

As estratégias nutricionais das algas muitas vezes decorrerão do seu ambiente característico, portanto, é preciso conhecer e considerar o habitat da espécie em questão, buscando atender os aspectos ambientais requeridos por ela ou, de que forma as características do meio influirão na obtenção dos produtos de interesse. Portanto, os meios também podem ser classificados como definidos (importante para estudos nutricionais, já que possui seus componentes bem conhecidos) ou indefinidos (contém um ou mais ingredientes

complexos), e ainda subdivididos entre marinhos ou de água doce. Ao formular um meio, também é importante estar atento ao crescimento bacteriano: para culturas contaminadas, ou não axênicas (inevitáveis em cultivos abertos), pode-se utilizar, estrategicamente, um meio com característica mineral e com fonte de carbono insuficiente, limitando o crescimento de organismos que não sejam as algas (LEE, 1989; ANDERSEN, 2005; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Os meios de cultivo apresentam um papel fundamental para o ótimo desenvolvimento das microalgas. Sendo assim, cada espécie exigirá determinadas concentrações que definirão a quantidade de nutrientes adicionados ao meio, bem como ajustes de pH, temperatura e luminosidade. Água marinha, nutrientes (substâncias contendo C, N, O, H, P, além de Ca, S, Mg e K), metais-traço (geralmente Fe, Mn, Cu, Mo e Co) , assim como quelantes, vitaminas e extrato de solo devem ser adicionados na proporção adequada (GRAHAM e WILCOX, 2000; ANDERSEN, 2005; SILVA, 2008).

O resultado de um estudo comparativo da velocidade específica de crescimento de algumas microalgas cultivadas comercialmente sob diferentes estratégias nutricionais foi realizado por LEE (2001) e pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação da velocidade específica máxima de crescimento de algumas microalgas cultivadas em meio fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico.

Espécies	Velocidade de crescimento específico máximo (h ⁻¹)		
	Fotoautotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,082	0,038 (glicose)	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,110	0,098 (glicose)	0,198 (glicose)
	0,081	0,050 (glicose)	0,131 (glicose)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	-	0,014 (acetato)	0,037 (acetato)
	0,013	0,009 (acetato)	0,024 (acetato)
<i>Scenedesmus acutus</i>	0,061	0,040 (glicose)	0,048 (glicose)
<i>Spirulina platensis</i>	0,028	0,008 (glicose)	0,026 (glicose)

Adaptado de: LEE, 2001.

2.1.2 Tecnologia de cultivo das microalgas

Considerando que o rendimento está relacionado ao aumento do uso eficiente de insumos e suprimentos, ou seja, ele decorre da relação entre a produção e o que se emprega de matérias-primas, trabalho e capital (máquinas e equipamentos). Como a tecnologia é o meio pelo qual os insumos são transformados em produtos, no caso, a biomassa algal, a tecnologia de cultivo deve ser o foco primário de qualquer esforço para melhoria do balanço econômico do processo e, num sentido mais restrito, proporcione maior quantidade de biomassa em menores intervalos de tempo (ROBBINS, 2000).

Historicamente se observam duas tendências distintas na construção de plantas para o cultivo de biomassa algal: uma com reatores fechados e também mais sofisticados, onde são empregadas cepas para produção de produtos biotecnológicos de maior valor e, outra com reatores abertos e mais baratos, destinados à produção de proteináceos ou outros constituintes celulares. Nesse segundo caso, o cultivo de microalgas pode ser entendido e comparado com um processo agrícola, pois tal como acontece com as culturas em solo, a temperatura, o clima, a incidência de luz solar e outros fatores determinam incrementos na produtividade, a qualidade da colheita e a intensidade dos impactos ambientais associados, geração de efluentes e alterações na qualidade da água. Ainda, a consistência e controle do processo de cultivo são críticos quanto à caracterização de toda a cadeia, seja ela agrícola ou industrial, pois embora a moderna agricultura seja relativamente consistente, as colheitas tendem a variar de acordo com a época e a região (BECKER, 1994; LEE, 2001; RYAN, 2009).

Esses fatores são ainda mais críticos para o cultivo de microalgas, onde se espera cultivar e colher, durante todo o ano, sob diferentes condições climáticas. Por exemplo, variações na luz e temperatura afetam os processos de fotossíntese que por sua vez, impactam as saídas dos sistemas produtivos (LEE, 2001; RYAN, 2009).

Os sistemas abertos, geralmente implementados graças à sua simplicidade e relativa acessibilidade, são os mais empregados atualmente em diversas regiões do mundo, principalmente por favorecerem o ganho de escala produtiva. São sistemas compostos de lagoas rasas – pré-existentes ou construídas – expostas à atmosfera ou em estufas e que podem ter dois formatos básicos:

- tipo *raceway* (circuito): formato mais empregado para cultivo comercial, garante boa capacidade de mistura pois conta com pás circulares, bombas ou defletores para circulação de nutrientes, gases e a cultura algal (ver Figura 1), garantindo boas taxas de crescimento algal de forma contínua;
- circular: são bastante utilizados e podem receber sistema de aeração, porém, apresentam relativamente menor capacidade de mistura quando comparados aos sistemas em circuito (BECKER, 1994; RYAN, 2009).



Tanques abertos

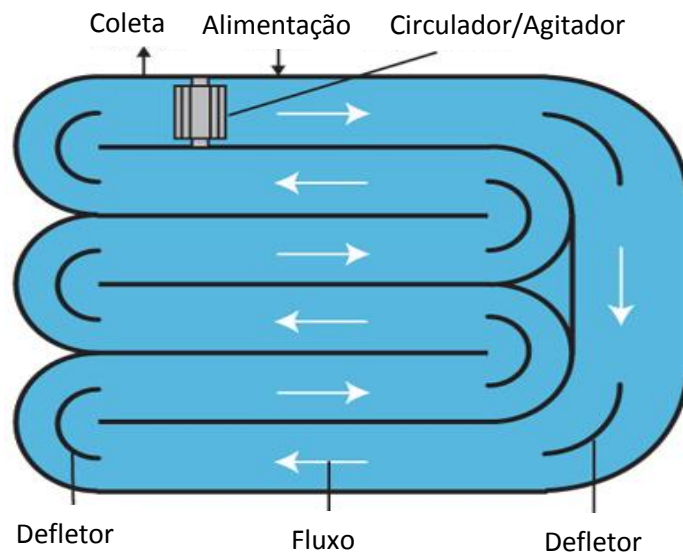


Figura 1 – Sistema de cultivo em circuito (raceway).
Adaptado de: WEN e JOHNSON (2008).

A escolha do tipo de fotobioreator a ser empregado deve ser resultado da análise de critérios técnicos e econômicos. Para a construção de reatores externos e com grandes volumes de cultivo, onde o meio permanece em contato constante com as paredes do fotobioreator, geralmente são empregadas membranas plásticas que precisam ser resistentes aos elementos químicos nele presentes e à luz UV, bem como ser resistente às variações de

temperatura, não ser tóxica e apresentar boa durabilidade de uma maneira geral, evitando a perda de biomassa (BECKER, 1994).

Já os sistemas de cultivo fechado, apresentam como vantagens principalmente a prevenção de contaminações atmosféricas e evitam a perda de água por evaporação. Os primeiros fotobioreatores desenvolvidos foram os tubulares (dispostos verticalmente), e reportados por volta do ano 1950, sendo que posteriormente muitos outros modelos foram testados e desenvolvidos buscando-se melhorar a produtividade, evitando problemas com as trocas gasosas, superaquecimento do meio, problemas hidráulicos e iluminação excessiva ou insuficiente (BECKER, 1994). O surgimento de variações nos aspectos construtivos, tais como sistemas híbridos (combinando sistema aberto e fechado), heterotróficos, mixotróficos e sistemas integrados de biofixação foi relatado por Ryan, em 2009. Já Eriksen (2008-a), relata que as pesquisas mais recentes no projeto de fotobioreatores fechados buscam o incremento de sua produtividade e compreendem basicamente:

- Fotobioreatores tubulares: nesses fotobioreatores, as culturas são bombeadas por longos tubos transparentes organizados horizontalmente e que permitem a entrada e saída de CO_2 e O_2 , respectivamente. Este tipo de fotobioreator, demonstrado nas Figuras 2 e 3, apresenta limitações quanto à ampliação e produção em larga escala;
- Fotobioreatores de painéis planos (Figura 3): suportam as mais altas densidades de células fotoautotróficas, onde uma fina, porém densa camada da cultura é misturada ou fluidizada pelas placas. A aplicação em culturas de *Chlorella* é bastante usual;
- Fotobioreatores de coluna: caracterizados como reatores ou colunas de bolhas dispostas verticalmente e iluminadas por paredes transparentes (ver Figura 3), proporcionam as melhores taxas de mistura, transferências gasosas e melhor controle das condições de crescimento. Também são geralmente empregados para técnicas experimentais ou para estratégias de *scale up* de culturas microalgais;
- fotobioreatores em formato de parábola ou domo.



Figura 2 – Sistema de crescimento tubular de alta densidade
Fonte: STEGER (2009)

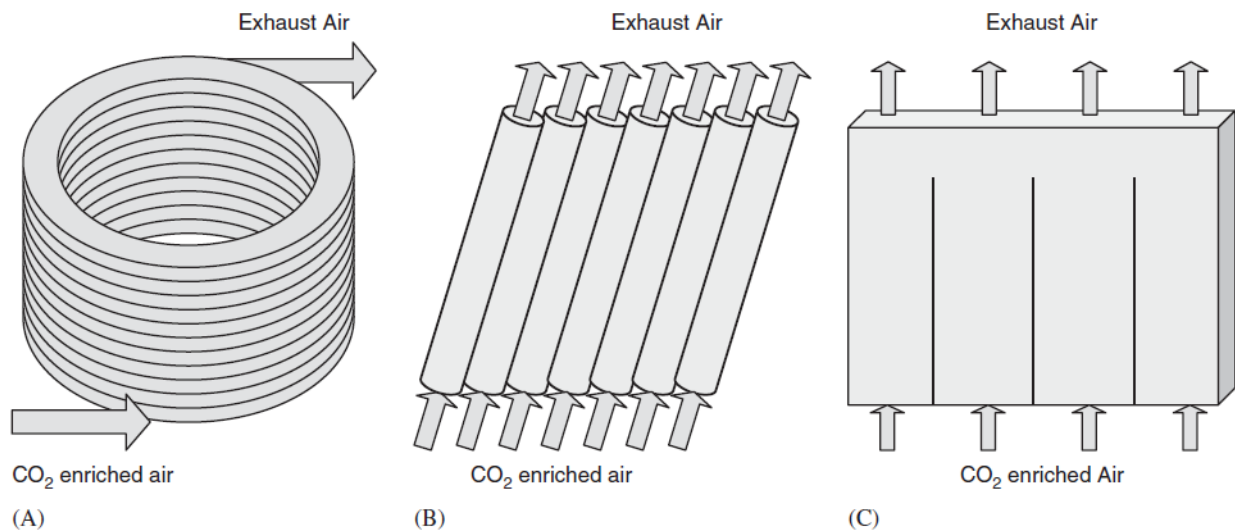


Figura 3 – Representação esquemática de um fotobioreator espiralado (A), uma coluna tubular inclinada (B) e um fotobioreator de placas planas vertical (C).
Fonte: MUNÓZ e GUIEYSSE (2006).

2.1.2.1 Luz

Os reatores para cultivo de microalgas são diferenciados daqueles projetados para o cultivo de outros micro-organismos. Isso se deve ao fato da maioria das microalgas serem fotoautotróficas e dependerem da luz como fonte energética, tornando esse aspecto um fator essencial no projeto de fotobioreatores. Uma vez que os fótons de luz podem ser absorvidos

pelas suas células como nutrientes, as propriedades da luz, como comprimento de onda e intensidade, são definitivamente fundamentais para seu crescimento. Isso também significa que a velocidade específica de crescimento das algas pode ser muito influenciada pela fonte de luz (WANG *et al*, 2007).

Como a ampla densidade luminosa é a principal característica de qualquer sistema fotossintético, deve-se considerar a correta distribuição da luz sobre o fotobioreator, bem como considerar sua intensidade, uma vez que se aplicada em demasia sobre sua superfície, provocará fotoinibição (crescimento limitado) e consequentemente, baixa conversão de energia luminosa em biomassa, isto é, baixa eficiência fotossintética (EF). A EF aumenta até o momento em que a iluminação em excesso torna-se um fator limitante ao crescimento, e por outro lado, a produtividade é negativamente afetada pela área central (zona de sombra) ou outras com iluminação deficiente (ERIKSEN, 2008-a).

Por outro lado, presume-se que a obtenção de determinados produtos microalgais pode ser influenciada pela intensidade ou o comprimento de onda disponível no meio. A luz solar produz um espectro visível de cores: vermelho, laranja, amarelo, verde, azul e violeta, sendo que a luz vermelha possui maior comprimento de onda e a menor energia do espectro visível, ao passo que a luz violeta possui menor comprimento de onda e maior energia. É esse espectro visível que proporciona a energia para a maioria dos produtores primários: quanto mais longo é o comprimento de onda, menor é a energia e mais rapidamente se dá sua absorção, sendo assim, numa coluna de água (Figura 4), a luz vermelha desaparecerá rapidamente, ao passo que a luz azul penetrará mais profundamente, considerando-se a exceção da luz violeta, que terá suas partículas dispersas de forma mais rápida por possuírem menor comprimento de onda. Considerando que a penetração da luz (densidade luminosa) de águas superficiais para águas mais profundas varia exponencialmente com a profundidade, conforme descrito pela lei de Beer-Lambert, sob certa profundidade a penetração insuficiente de luminosidade impedirá a fotossíntese e o desenvolvimento algal (FLETCHER, 1979; NOAA-OE, 2011).

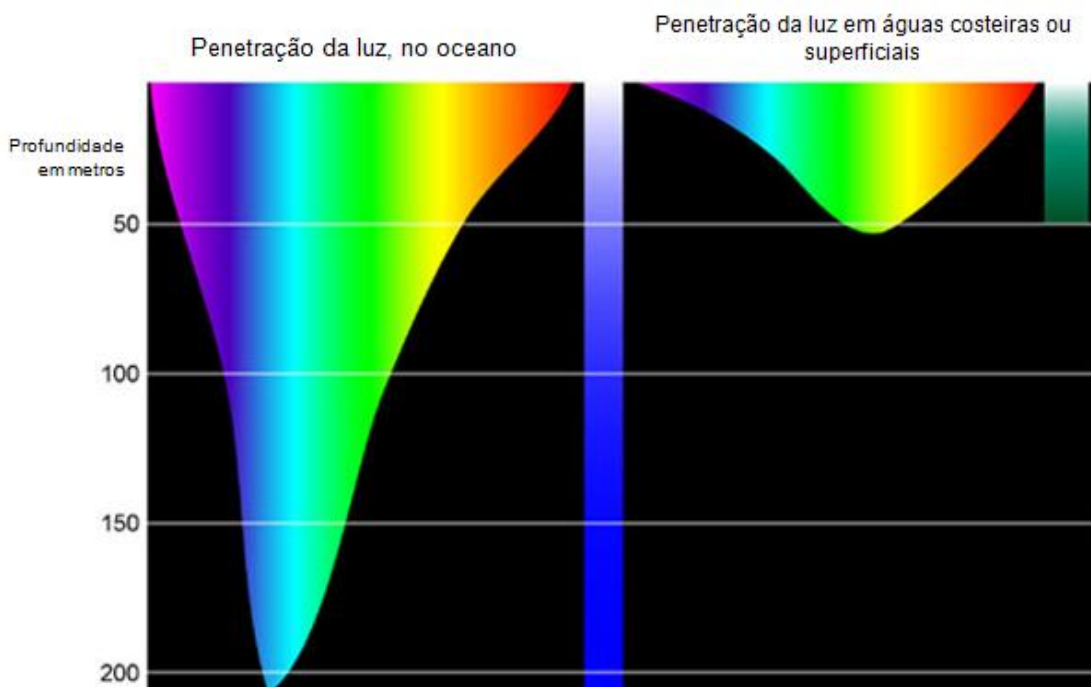


Figura 4 – Representação da profundidade com que as diferentes cores da luz penetra nas águas dos oceanos.

Adaptado de: NOAA-OE (2011).

A densidade luminosa pode ser manipulada com filtros. A faixa de densidade luminosa mais utilizada em cultivos situa-se entre 100 e 200 $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ (8 a 16 klux), o que corresponde a cerca de 5 – 10% da irradiação solar (2000 $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ou 160 klux). Muitas espécies microalgais não crescem bem sob iluminação constante, sendo assim, utiliza-se um ciclo luz/escuro (LE) máximo de 16:8 (LE), geralmente 14:10 ou 12:12. Outro aspecto a considerar é a iluminação artificial, que pode ser feita com lâmpadas emitindo luz no espectro azul e vermelho, já que são as porções mais ativas do espectro luminoso na fotossíntese (GUALTIERI e BARSANTI, 2006; WANG *et al*, 2007).

2.1.2.2 Agitação e aeração

A agitação e a aeração das culturas de microalgas são importantes para uma distribuição homogênea das células, metabólitos, manutenção da temperatura e para a transferência de gases através da interface gás-líquido. O ar contém a fonte de carbono para a fotossíntese na forma de dióxido de carbono, mas, para culturas muito densas o CO_2 originário do ar e borbulhado através da cultura pode ser insuficiente e um limitante do crescimento. Basta

lembrar a reação geral da fotossíntese, onde para cada mol de CO_2 fixado, outro mol de O_2 é liberado e em determinado momento, pode haver uma saturação de O_2 na cultura, provocando morte foto-oxidativa. Sendo assim, dependendo das condições de cultivo e do formato do fotobioreator pode ser necessário suplementar dióxido de carbono, por exemplo, numa proporção de 1% do volume de ar alimentado, garantindo ainda uma maior estabilidade quanto às mudanças no pH, graças ao balanço $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ na solução (BECKER, 1994; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Nem todas as espécies algais toleram agitação vigorosa - basta lembrar que no ambiente natural elas dificilmente sofrem regimes turbulentos, portanto, alguns métodos podem danificar as células. A agitação pode ser feita por borbulhamento com ar, pás circulares para plâncton ou ainda bombeamento. A agitação influencia no regime luminoso de tanques externos, portanto, deve ser curta de forma a manter elevada a EF (Eficiência Fotossintética). Por outro lado, em sistemas fechados, um fluxo turbulento de agitação pode ser favorável, uma vez que melhora a circulação interna e evita o depósito de células em zonas escuras (ERIKSEN, 2008-a; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

2.1.2.3 Água

Sistemas abertos podem utilizar diferentes tipos de água, incluindo água fresca, salobra, alcalina, marinha, eutrófica ou uma mistura delas. O tipo de água utilizada ditará o sistema de cultivo implementado, a espécie de alga cultivada e os nutrientes necessários. O emprego de águas salobras ou residuárias pode apresentar variações sazonais em sua composição e qualidade, podendo inclusive conter resíduos químicos como fertilizantes e metais pesados, prejudicando a qualidade da biomassa produzida e dificultando até mesmo a sobrevivência da cultura (BECKER, 1994; RYAN, 2009).

2.1.2.4 Temperatura

A temperatura utilizada para manutenção das culturas geralmente é a mais próxima daquela onde os organismos foram coletados. Para organismos de clima polar, mantém-se $T < 10^\circ\text{C}$; organismos de clima temperado são cultivados com temperatura entre $10\text{-}25^\circ\text{C}$ e temperatura superior a 20°C é usada para aqueles característicos de regiões com clima

tropical. A maioria das espécies de microalgas cultivadas toleram temperaturas entre 16 e 27°C, porém, isso pode variar conforme o meio de cultura, a espécie ou a cepa utilizada. Incubadoras geralmente usam temperatura controlada e constante, sendo que a transferência para diferentes temperaturas pode ser conduzida de forma a alterar apenas 2°C por semana. De uma forma geral, temperaturas inferiores a 16°C reduzirão o crescimento e temperaturas superiores a 35°C poderão ser fatais para várias espécies (GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

2.1.2.5 pH

A faixa de pH para a maioria das espécies de algas cultivadas situa-se entre 7 e 9, e a faixa ótima entre 8,2 e 8,7, porém, algumas espécies adaptam-se melhor em ambientes mais ácidos ou básicos. A cultura pode entrar em completo colapso quanto houver alguma falha na manutenção de um pH aceitável. Nos casos de culturas microalgais muito densas, a adição de dióxido de carbono permite corrigir o pH elevado. Uma alternativa para conjugar agitação e acidez/alcalinidade das culturas é a instalação de um sensor de pH, de forma a otimizar o suprimento de CO₂, evitando perdas, já que o pH é um fator determinante para a solubilidade do CO₂ (BECKER, 1994; ANDERSEN, 2005; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

2.1.3 Seleção de cepas e bancos de linhagens

Uma grande variedade de cepas e espécies algais são testadas com a finalidade de identificar sua adequação aos sistemas de produção de larga escala, já que muitas vezes os parâmetros ambientais influenciam decisivamente na produção de determinado composto de interesse biotecnológico. Fatores como: resposta às flutuações diárias de temperatura, resistência à fotoinibição, porcentual de respiração noturna (a evitar, já que incorre na perda de biomassa produzida durante o dia), sensibilidade às altas concentrações de oxigênio e sensibilidade ao estresse osmótico provocado por altas taxas de evaporação ou adição de meio de cultivo fresco precisam ser estudados, conhecidos e controlados, garantindo o sucesso do cultivo com alta produtividade (BECKER, 1994; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Bancos de linhagens também catalogam e disponibilizam para comercialização algumas espécies algais. Alguns exemplos são:

- SAG (Experimentelle Phykologie und Sammlung Von Algenkulturen, University of Gottigen);
- BCCUSP (Brazilian Cyanobacteria Collection - University of Sao Paulo, Brasil);
- UTEX (Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin);
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Argyll, Escócia);
- UTCC (University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria);
- CCMP (The Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, Maine);
- ACOI (The Culture Collection of Algae, Universidade de Coimbra, Portugal);
- BANGAL (Banco Nacional de Germoplasma de Algas, CAA / Univ. Las Palmas de G.C., Las Palmas, Espanha);
- CCALA (Culture Collection of Autotrophic Organisms, Institute of Botany, Academy of Sciences, Trebon, República Tcheca);
- PCC (Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains, Institut Pasteur, Paris, França).

2.1.4 Microalgas: seus produtos e aplicações

A aplicação mais comum das microalgas tem sido a aquicultura, para a alimentação direta ou indireta de outros animais como peixes, moluscos e crustáceos. Além de produtoras de biomassa, algumas espécies de microalgas são cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poli-insaturados e os pigmentos que apresentam propriedades terapêuticas. Também podem ser comercializadas como suplemento alimentar, na forma de pó, tabletes, cápsulas e extratos, ou incorporadas em alimentos como massas, pães e iogurtes, sendo comercializadas em diversos países (BOROWITZKA, 1999; DERNER, 2006).

Para utilização da sua biomassa, bem como a extração de alguma substância de interesse, é necessário um processo de separação da biomassa do meio de cultura, o qual envolve centrifugação, filtração, desidratação ou liofilização. Já para extração dos metabólitos intracelulares, geralmente são empregadas técnicas de rompimento celular por ultra-som, choque osmótico, enzimas, solventes, etc. e em seguida, alguma etapa de purificação, como ultrafiltração, precipitação, cromatografia, etc. (BECKER, 1994; SILVA, 2008)

Algumas espécies de microalgas já são bem conhecidas quanto ao potencial de cultivo e compostos que sintetizam. As principais microalgas cultivadas comercialmente são as espécies dos gêneros *Chlorella* (Chlorophyceae) e *Spirulina* (Cyanophyceae) para utilização como ingrediente de alimentos funcionais ou saudáveis, *Dunaliella salina* para obtenção de beta-caroteno e *Haematococcus pluvialis* para obtenção de astaxantina (BECKER, 2004).

É importante salientar que não há legislação ou regulamentação específica para o mercado ou os produtos das microalgas. Órgãos como o FDA (*US Food and Drug Administration*) ou a FAO (*Food and Agriculture Organization of The United Nations*) apenas mencionam a possibilidade de uso do pó de *Spirulina*, por exemplo, para alimentação ou consumo humano - status GRAS, isto é, produto geralmente reconhecido como seguro - e há um alerta por parte do FDA sobre a toxicidade de algumas cianobactérias.

A utilização de biomassa microalgal na alimentação humana, embora testada com sucesso, requer segurança quanto à inexistência de riscos microbiológicos e contaminação química, principalmente por metais pesados. Morist *et al*, (2001) apresenta estudos relacionados ao processo para remoção dos sais presentes no meio de cultivo (*washing*), bem como os testes realizados para pasteurização ou secagem por *spray-drying*, favorecendo à conservação de biomassa algal por longos períodos sob refrigeração. O mesmo autor salienta que as propriedades nutricionais permanecem praticamente inalteradas após esses processos, embora o conteúdo de pigmentos com propriedades funcionais, como a ficocianina, tenha reduzido em cerca de 50%. Moraes *et al*, (2009) também apresentam resultados favoráveis à utilização de *Spirulina platensis* na dieta humana, principalmente por apresentarem níveis aceitáveis de metais pesados. Por outro lado, as características organolépticas dos produtos de microalgas, como o sabor e aroma parecidos com o de peixe e a coloração verde/azulada dificultam sua aceitação para utilização na culinária tradicional (BECKER, 2007).

A Tabela 4, a seguir, apresenta exemplos de produtos das microalgas cultivadas atualmente - alguns deles são produtos de elevado valor comercial - e suas perspectivas de mercado:

Tabela 4 – Produtos, aplicações e valor de mercado.

Grupo – Biomassa	Micro-organismo ¹	Aplicação	Valor (milhares de US\$/kg)	Mercado (milhões de US\$/kg)
Alimento funcional (Spirulina)	<i>Spirulina platensis</i>	Suplemento nutricional	0,015 – 0,02	10 – 15
Alimento funcional (Chlorella)	<i>Chlorella</i> spp.	Suplemento nutricional	0,02 – 0,025	5 -10
Alimento funcional (Dunaliella)	<i>Dunaliella salina</i>	Suplemento nutricional	0,08 – 0,1	10 -15
Alimento animal	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Alimentação animal	0,01	3 – 5
Astaxantina (crua)	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella</i>	Alimentação de peixes	0,25 – 0,4	15 – 20
Grupo – Ácidos Graxos	Micro-organismo ¹	Aplicação	Valor (milhares de US\$/kg)	Mercado (milhões de US\$/kg)
Ácido linoléico	<i>Chlorella</i>	Aditivo alimentar	10,1 – 50,1	5 – 10
Ácido linolênico	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i>	Aditivo alimentar	20,4 – 83,4	5 – 10
Ácido α-linolênico	<i>Spirulina</i>	Aditivo alimentar	227	5 – 10
Ácido eicosapentanóico	<i>Phaeodactylum</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Chlorella</i>	Uso médico, suplemento nutricional, cosméticos	4,8 – 6,4	30 – 50
Ácido docosaheptaenóico	<i>Amphiridium</i>	Uso médico, suplemento nutricional, cosméticos	3 – 4,8	5 – 10
Ácido araquidônico	<i>Porphyridium cruentum</i>	Uso médico, suplemento nutricional, cosméticos	2,88 – 5,38	5 – 10
Grupo – Enzimas	Micro-organismo ¹	Aplicação	Valor (milhares de US\$/kg)	Mercado (milhões de US\$/kg)
Fosfoglicerato quinase (PGK) 70%	<i>Spirulina platensis</i>	Pesquisa, medicina	31 – 77	0,5 – 1
L-aminoácido oxidase (AAO)	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Anacystis nidulans</i>	Pesquisa, medicina	280 – 455	0,5 – 1
Glicerol desidrogenase (GDH)	<i>Dunaliella salina</i>	Pesquisa, medicina	61 – 229	0,5 – 1
Superóxido dismutase (SOD) 99%	<i>Porphyridium</i> , <i>Spirulina platensis</i>	Medicina, suplemento nutricional	28 – 360	50 – 80
Endonuclease AVA I/II	<i>Spirulina</i> e outras cianofíceas	Pesquisa, medicina	62 – 124	0,5 – 1
Grupo – Enzimas	Micro-organismo ¹	Aplicação	Valor (milhares de US\$/kg)	Mercado (milhões de US\$/kg)

			de US\$/kg)	US\$/kg)
Químicos marcados com isótopos estáveis	<i>Chlorella vulgaris</i>	Pesquisa, medicina	1 – 15	15 – 25

Adaptado de: SPOLAORE *et al*, (2006); DERNER (2006); ULP GC (2009)

Nota: ¹O micro-organismo ou a cepa possuem produtividade variável, em virtude das condições de cultivo ou rendimento esperado.

Outros produtos obtidos a partir das microalgas são os esteróis e toxinas com aplicações em pesquisas científicas, luciferase, luciferina, ácido-poli-beta-hidroxibutírico – PHB e aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico) para aplicações na medicina e como suplementos nutricionais ou para aquicultura, o β -1,3-glicano, vitaminas C, E e B₁₂, polissacarídeos, alguns extratos e luteína (SPOLAORE *et al*, 2006; DERNER, 2006; ULP GC, 2009).

2.1.4.1 Aspectos ambientais

Foram obtidos bons resultados na aplicação das microalgas em processos de purificação de águas e também para remoção ou concentração de nutrientes como o fósforo e nitrogênio de águas residuárias. A capacidade desses organismos acumularem altas quantidades de substâncias potencialmente perigosas tem sido explorada em técnicas de biorremediação, especialmente de águas poluídas com metais pesados e na sua utilização como bioindicadores para a medida da toxicidade de determinado ambiente (DE-BASHAN e BASHAN, 2004; GARRIDO, 2008).

Uma importante característica relatada por Ryan (2009) e Derner (2006) refere-se à capacidade que as algas possuem em absorver e converter as emissões de CO₂, resultantes da combustão de combustíveis fósseis, em biocombustíveis. Ryan (2009) ainda informa que algumas cepas de microalgas conseguem fixar grandes quantidades de CO₂: cerca de 1,5 a 1,8 t de CO₂ para produzir 1,0 t de biomassa algal. Então, quando o suprimento de dióxido de carbono se faz necessário para incrementar a produtividade do meio de cultivo algal, uma alternativa é a captação do CO₂ originado em processos de fermentação ou combustão, como foi relatado no trabalho de Camerini (2008) com a microalga *Spirulina platensis* e através das análises de Sydney *et al*, (2010), realizadas com cepas de *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* e *Botryococcus braunii*.

Resumidamente, os principais benefícios ambientais do cultivo de microalgas apontados por Olguín *et al*, (2001, 2003), Munõz e Guieysse (2006), Camerini (2008) e Ryan (2009) são:

- Mínima competição com as culturas alimentares por terras agricultáveis;
- Menor necessidade de água do que outros biocombustíveis produzidos tradicionalmente;
- Biofixação e biorremediação: economia no tratamento de efluentes e melhor qualidade da água;
- Potencial prevenção e mitigação da eutrofização/zonas mortas;
- Alta produção de biomassa por unidade de área;
- Uso de emissões industriais de gases, reduzindo possível contribuição desses gases no agravamento do efeito estufa.

Por outro lado, os mesmos autores apresentam algumas preocupações com relação a este tipo de cultivo, dentre elas:

- Manutenção sustentável dos níveis dos reservatórios de água superficial e dos aquíferos;
- A competição com as lavouras por terras ocupáveis pode surgir em determinados sistemas;
- A qualidade da água utilizada afeta a qualidade da biomassa, resultando em mais etapas de melhoria do processo, conseqüentemente, maiores requerimentos de energia;
- Grandes áreas de cultivo podem alterar os hábitat nativos e padrões migratórios;
- Algas exóticas, modificadas ou espécies invasivas podem afetar a integridade dos ecossistemas regionais e de agricultura orgânica;
- As necessidades de energia podem afetar severamente o balanço positivo de energia;
- Os sistemas podem incluir materiais (materiais translúcidos, lâmpadas, isolamentos) com alto potencial de contaminação ambiental, ou outros impactos ambientais;

Dessa forma, todos os impactos ambientais relacionados ao cultivo precisam ser identificados e tratados como uma forma de desenvolver melhores e mais eficientes técnicas de cultivo.

2.1.4.2 Microalgas produtoras de pigmentos

O sensível crescimento na importância de corantes naturais, especialmente em alimentos e cosméticos, provoca uma grande demanda por fontes naturais de corantes. Cianobactérias e outras algas possuem um amplo espectro de componentes pigmentados, incluindo os carotenóides, as ficobiliproteínas e as clorofilas, que são constituídas por diferentes sub-unidades (*a* e *b*) de polipeptídios (BECKER, 1994; SARADA *et al*, 1999). Segundo Lee (1989), a clorofila-*a* está presente em maior quantidade nas cianobactérias. Além das clorofilas, os principais grupos de pigmentos naturais extraídos das microalgas são:

- *Carotenóides e Xantofilas*

Os carotenóides podem ser divididos em dois grupos principais: os carotenos, que são pigmentos livres de oxigênio em suas cadeias hidrocarbônicas e as xantofilas, que são seus derivados oxigenados. Apesar de serem conhecidos mais de 400 carotenóides, somente alguns poucos são utilizados comercialmente: β -caroteno (pigmento amarelo), astaxantina e, com menor frequência, luteína, zeaxantina e licopeno. Suas principais aplicações são como corante de alimentos, cosméticos ou alimentação animal (frango e peixe). Suas propriedades nutricionais e relevância terapêutica relacionam-se com a ação pró-vitamina A e outras propriedades intrínsecas, como a ação antioxidante, anti-inflamatória e uma possível associação à prevenção de câncer. Alguns carotenóides podem ser obtidos por via sintética e com menor custo, porém, sabe-se que a absorção do isômero natural é geralmente superior à do sintético (BECKER, 1994; SPOLAORE *et al*, 2006; GRAHAM e WILCOX, 2000; DUFOSSÉ *et al*, 2005)

Segundo os mesmos autores, a microalga halofílica flagelada *Dunaliella salina* é o micro-organismo mais utilizado na produção de β -caroteno, já que essa molécula pode representar mais de 14% do seu peso seco, por ser altamente protéica e também apresentar boa quantidade de ácidos graxos essenciais, podendo ser utilizada com segurança graças ao seu padrão alimentício (GRAS) e sendo frequentemente associada com função anti-hipertensiva, broncodilatadora, analgésica, relaxante muscular e atividade anti-endema.

A astaxantina, por sua vez, é consumida principalmente pela indústria produtora de alimentação (ração) para salmão. Obtida a partir da microalga verde *Haematococcus pluvialis*, em alguns mercados dificilmente consegue-se competir com o pigmento obtido de forma artificial, porém, em determinadas situações regulatórias ou por demanda dos consumidores, o

produto natural obtido das microalgas pode ser utilizado. De maneira semelhante ao que aconteceu com a indústria produtora de pigmentos artificiais, a tendência atual para aumentar a competitividade frente ao produto sintético é a migração das plantas produtoras de pigmentos naturais para países como a China, onde os custos com áreas, energia e operação, são menores.

- *Ficobiliproteínas*

O aparato fotossintético de algumas algas está localizado em membranas denominadas tilacóides. Essas membranas apresentam consideráveis variações estruturais, conforme a espécie e ainda podem variar conforme as condições de crescimento e sua especificidade taxonômica. Na maioria das espécies, as tilacóides arranjam-se perifericamente em cerca de três a seis camadas paralelas. Já em outros organismos como *Oscillatoria* e *Arthrospira*, as tilacóides são orientadas perpendicularmente ao sentido da sua membrana celular (BECKER, 1994; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Na medida em que ocorre a divisão celular, as tilacóides também se dividem. Proteínas, lipídeos, carotenóides e clorofila-*a* são os seus maiores componentes. No lado oposto dessa superfície, observam-se grandes estruturas granulares (com alguns milhões de daltons) estreitamente ligadas e que funcionam como reservatório de compostos nitrogenados das células. Estas estruturas granulares são chamadas de ficobilissomos e é através delas que a alga garante a sua alta capacidade de absorção da energia luminosa, suprimindo as faixas de absorção onde a clorofila-*a* e os carotenóides não são efetivos. Isso é possível porque nos ficobilissomos estão contidas sub-unidades denominadas ficobiliproteínas, onde cadeias polipeptídicas possuem centenas de grupos prostéticos (bilinas) covalentemente ligados. Essas ficobiliproteínas são denominadas ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina (BECKER, 1994; BREJC *et al*, 1995; BERG *et al*, 2002; GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

Nos ficobilissomos, os pigmentos dispõem-se de acordo com suas formas espectrais (demonstrado na Figura 5), onde é possível constatar as hastes contendo ficoeritrina (PE) e ficocianina (PC) que emergem de um núcleo formado de aloficocianina (AP) e aloficocianina B (APB) e o núcleo central ligado à membrana tilacóide. Os ficobilissomos que apresentam fluorescência em comprimentos de onda mais curto (maior energia), alojam-se nas unidades periféricas dessas “antenas” (ficoeritrina, que é vermelha, Absorção_{máx} = 562 nm e Emissão_{máx} = 575 nm), enquanto aqueles com o maior comprimento de onda (menor energia) permanecem na base das hastes (ficocianina, com coloração azul intenso, Absorção_{máx} = 620 nm e

Emissão_{máx} = 647 nm) e a aloficocianina (coloração verde azulada, Absorção_{máx} = 652 nm e Emissão_{máx} = 660 nm). A transferência de energia nos complexos é, portanto, das pontas para o núcleo, ou seja, por gradiente de energia, chegando finalmente até o receptor (clorofila-a) na membrana tilacóide. (BECKER, 1994; BREJC *et al*, 1995; BERG *et al*, 2002; GUALTIERI e BARSANTI, 2006; SILVA, 2008).

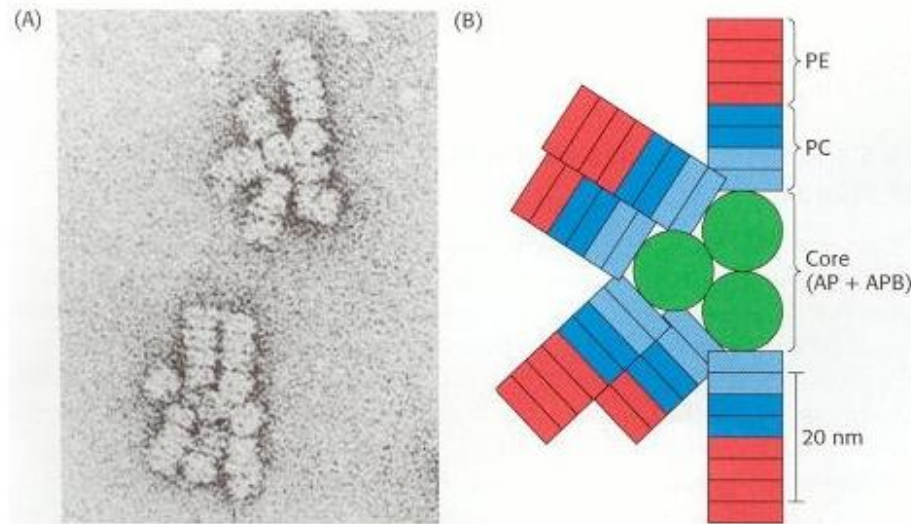


Figura 5 – Micrografia eletrônica de uma cianobactéria (*Synechocystis*) e seus ficobilissomos (A). Representação de um ficobilissomo da cianobactéria *Synechocystis* 6701 (B).
Fonte: BERG *et al*, 2002.

O fato de cada pigmento absorver apenas determinados comprimentos de onda é compensado pela presença de pigmentos acessórios que graças às suas propriedades espectrais, contribuem para a eficiência superior a 95% na captação e transferência de energia obtida da radiação solar, conforme demonstrado na Figura 6 (GROSSMAN *et al*, 1993).

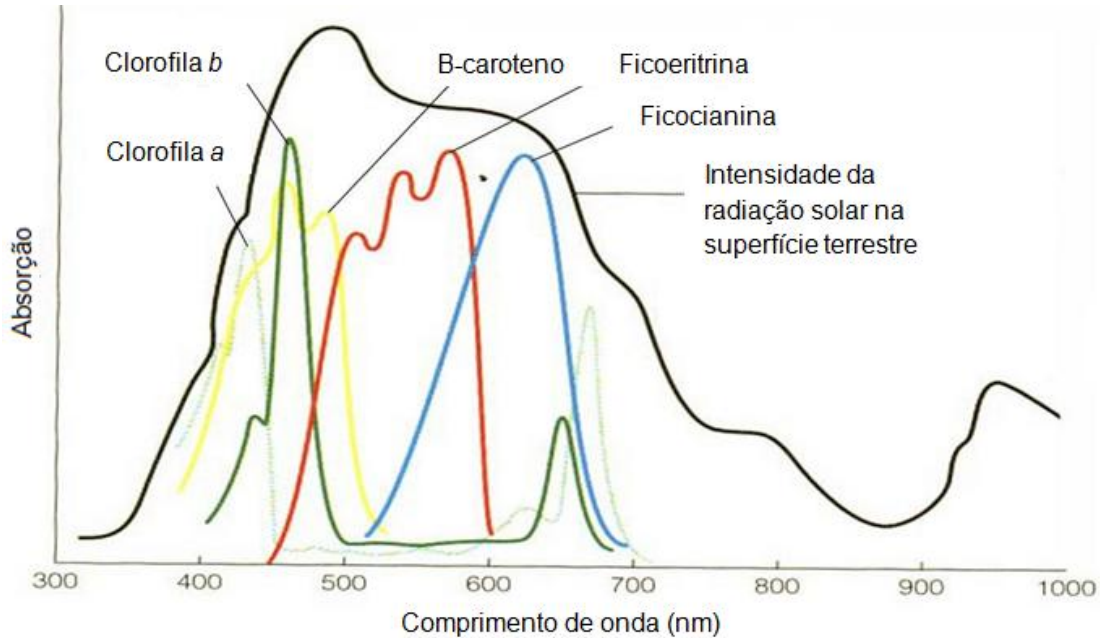


Figura 6 – Espectro de absorção das clorofilas e demais pigmentos. Adaptado de: CAMPBELL e REECE, 2001.

Os principais micro-organismos utilizados na produção comercial das ficobiliproteínas como a ficocianina e a ficoeritrina são a cianobactéria *Spirulina* e a rodófito *Porphyridium*, respectivamente. O potencial primário dessas moléculas parece ser seu uso como corantes naturais, mas um crescente número de pesquisas vem demonstrando propriedades relacionadas com benefícios à saúde e ampla aplicação farmacêutica. Ainda, as ficobiliproteínas são muito utilizadas em ensaios laboratoriais e pesquisas imunológicas, graças às suas propriedades, melhor explicitadas no tópico seguinte (2.1.4.3). Por outro lado, é importante atentar para a finalidade da sua aplicação, considerando que muitos micro-organismos apresentam algum tipo de toxicidade (BECKER, 1994; GRAHAM e WILCOX, 2000; SILVA, 2008; ERIKSEN, 2008-a).

Considerando a função fotossintética das ficobiliproteínas, a Figura 7 representa um processo de aclimação cromática complementar, ou seja, quando um organismo fotossintético (como as cianobactérias) modificam sua estrutura de captação de luz e seus processos celulares para adaptar-se às mudanças na cor da luz ambiente. Essa modificação pode chegar ao extremo de uma completa reestruturação do ficobilissomo, sendo que o processo é mais sensível à luz vermelha, que leva à produção de ficobilissomos contendo ficocianina (azul brilhante) e da luz verde, o que resulta na síntese de ficobilissomos contendo ficoeritrina (pigmento avermelhado). A expressão de muitos genes é regulada por este processo, incluindo

os que codificam os componentes do ficobilissomo. O processo de aclimação permite que essas células alterem suas características de absorção da luz conforme a disponibilidade para a fotossíntese sob várias profundidades, em lagos e oceanos (GRAHAM e WILCOX, 2000; THE KEHOE LABORATORY, 2009, KEHOE, 2010).

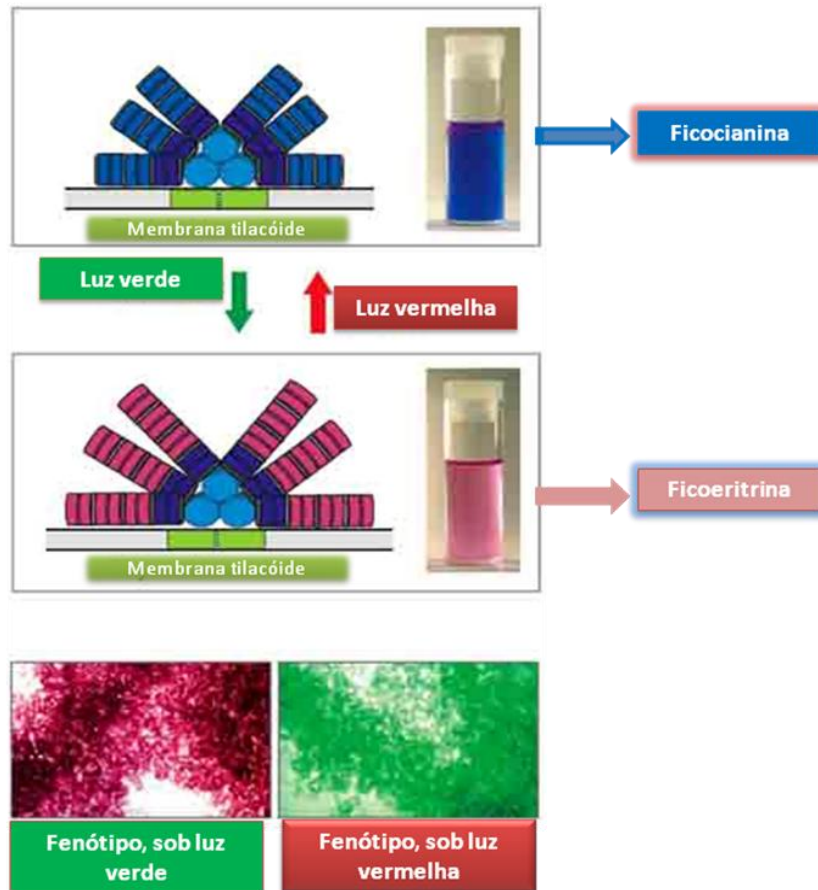


Figura 7 – Representação do processo de aclimação cromática complementar da cianobactéria do gênero *Synechococcus*. Adaptado de: THE KEHOE LABORATORY, 2009

Além da Ficocianina (PC), a Aloficocianina (APC) extraída da *Spirulina* também pode ser adquirida para utilização em ensaios imunológicos e como marcador celular fluorescente, assim como a R-ficoeritrina, que é extraída de algas vermelhas como a *Porphyridium Cruentum*. Diversas empresas comercializam os pigmentos obtidos a partir das microalgas e a Tabela 5, a seguir, apresenta alguns dos principais pigmentos presentes nas divisões de algas:

Tabela 5 – Pigmentos encontrados nas diferentes divisões de algas.

DIVISÃO	PIGMENTOS			
	Clorofilas	Ficobilinas	Carotenóides	Xantofilas
Cyanophyta	<i>a</i>	<i>c</i> -Ficoeritrina <i>c</i> -Ficocianina Aloficocianina Ficoeritrina	β -Caroteno	Mixoxantina Zeaxantina
Prochlorophyta	<i>a, b</i>	Ausente	β -Caroteno	Zeaxantina
Glaucophyta	<i>a</i>	<i>c</i> -Ficocianina Aloficocianina	β -Caroteno	Zeaxantina
Rhodophyta	<i>a</i>	<i>r, b</i> -Ficoeritrina <i>r</i> -Ficocianina Aloficocianina	α - e β -Caroteno	Luteína
Cryptophyta	<i>a, c</i>	Ficoeritrina-545 <i>r</i> -Ficocianina	α - e β -Caroteno	Aloxantina
Heterokontophyta	<i>a, c</i>	Ausente	α -, β - e ε - Caroteno	Violaxantina
Haptophyta	<i>a, c</i>	Ausente	α - e β -Caroteno	Fucoxantina Peridina
Dinophyta	<i>a, b, c</i>	Ausente	β -Caroteno	Fucoxantina Diadinoxantina Dinoxantina Giroxantina
Euglenophyta	<i>a, b</i>	Ausente	β - e γ -Caroteno	Diadinoxantina Luteína
Chlorarachniophyta	<i>a, b</i>	Ausente	Ausente	Neoxantina Violaxantina
Chlorophyta	<i>a, b</i>	Ausente	α -, β - e γ - Caroteno	Luteína Prasinoxantina Astaxantina

Adaptado de: GRAHAM e WILCOX, 2000 e GUALTIERI e BARSANTI, 2006.

Enquanto isso, a Tabela 6 relaciona os pigmentos ou produtos de sua associação, demonstrando o elevado valor comercial, bem como algumas aplicações.

A microalga com melhor produtividade de ficocianina (cerca de 120 – 140 mg de ficocianina por grama de biomassa seca) é a *Spirulina platensis*, conforme relatado por vários pesquisadores, dentre eles Eriksen (2008-a). Dufossé *et al*, (2005) também afirmam que a maioria das cianobactérias são produtoras de ficocianina e que algumas outras microalgas, como a microalga vermelha *Porphyridium aerugineum* (marinha), também são capazes de produzi-la.

Tabela 6 – Pigmentos ou associação de pigmentos obtidos das microalgas, valor comercial e aplicações.

Molécula	Valor (em US\$.mg ⁻¹) ¹	Aplicação
Aloficocianina	6-25	Ensaio imunológico e diagnóstico
Astaxantina	2.5	Pigmento-corante (indústria de pescado)
Estreptavidina (B-ficoeritrina)	50	Ensaio imunológico e diagnóstico
Ficocianina	25	Pigmento-corante (alimentos, cosméticos, fármacos), ensaio imunológico e diagnóstico
IgG (R-ficoeritrina)	50	Ensaio imunológico e diagnóstico
R-ficoeritrina	3.25-25	Ensaio imunológico e diagnóstico
β-caroteno	0.3-3	Pigmento-corante

Adaptado de: SPOLAORE *et al*, (2006); DERNER (2006); UPGC (2009); PROZYME (2010-a); PROZYME (2010-b); PROZYME (2010-c).

Nota: ¹ Sujeito às características de pureza do produto e às variações do mercado;

Schmidt *et al*, (2005) e Sloth *et al*, (2006) também obtiveram ótima produção de ficocianina a partir de culturas heterotróficas e mixotróficas de *Galdieria sulphuraria*. A produção de ficocianina com *Synechococcus* sp. (*Anacystis nidulans*) também foi obtida por Gupta e Sainis (2009). Singh *et al*, (2009) buscaram a otimização de um meio de cultura para aumentar a produção de ficocianina a partir de outra cianobactéria, a *Phormidium ceylanicum*.

A extração, purificação e caracterização de ficocianina a partir da cianobactéria *Oscillatoria quadripunctulata* foi realizada por Soni *et al*, (2006). Já a microalga *Spirulina fusciformis* exposta à luz azul apresentou ficocianina com excelente atividade antioxidante *in vitro* (MADHYASTHA *et al*, 2009). CRAIG e CARR (1968) identificaram a presença de ficocianina em espécies como *Anacystis nidulans* e *Anabaena variabilis*.

2.1.4.3 Ficocianina

A ficocianina, cuja aplicação será mais detalhada no item 2.1.4.6, é solúvel em água, altamente fluorescente e possui aplicabilidade estende-se pela biotecnologia, uso em cosméticos, alimentos, ensaios diagnósticos e na medicina (ERIKSEN, 2008-b).

Pádula *et al*, (1996) e Romay *et al*, (1998), salientam que a ficocianina pertence ao fotosistema II das cianofíceas que, em ação conjunta com a clorofila, é responsável pela

recepção da luz pela alga, impulsionando a transmissão dos elétrons através de uma cadeia de aceptores. Esse pigmento é uma biliproteína composta de duas sub-unidades de monômeros α e β as quais contêm pelo menos três ligações covalentes com cromóforos bilinas, numa cadeia aberta tetrapirrólica. A Figura 8 apresenta a fórmula estrutural da ficocianina.

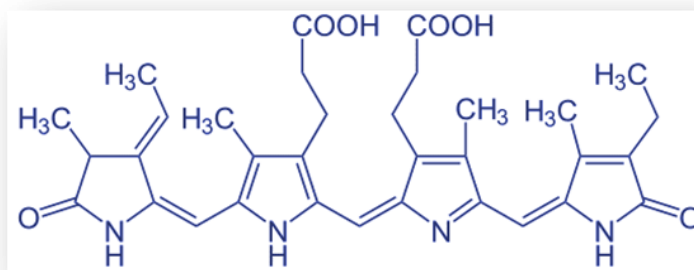


Figura 8 – Fórmula estrutural do pigmento ficocianina.
Adaptado de: SPOLAORE (2006).

Fluorescente e com absortividade extremamente alta, a ficocianina possui bandas de emissão e excitação em comprimentos de onda dentro da faixa do visível: absorção máxima a 620 nm e emissão máxima a 652 nm. É uma proteína bastante estável em temperaturas entre 4 e 10°C, com ponto isoelétrico (PI) próximo a 4,65 e que pode ser facilmente ligada a anticorpos e outras proteínas por técnicas bastante convencionais sem alterar suas características de espectro, além de possuir alto coeficiente de absorbância molar e emissão, estabilidade oligomérica, e alta foto-estabilidade. (SILVA, 2008; PROZYME, 2010-a).

2.1.4.4 Extração e purificação da ficocianina

- *Extração*

A ficocianina pode ser extraída das cianobactérias e microalgas por diferentes procedimentos, que combinam o rompimento das paredes celulares com a extração das ficobiliproteínas num meio aquoso ou a partir da biomassa seca de *S. platensis* ao ressuspender essa biomassa em tampão fosfato 0,1 M e pH 7. Outro aspecto a considerar é a temperatura da extração, já que temperaturas mais elevadas decrescem o percentual de pigmento obtido. Para biomassa úmida, a ficocianina pode ser extraída através de ciclos de congelamento (entre -25°C e -15°C) e descongelamento (entre 4 e 30°C). Outros processos, como rompimento mecânico das células, sonicação, tratamento enzimático, uso de solventes,

etc., também são relatados por diferentes autores, porém, a melhor eficiência foi obtida através dos ciclos de congelamento/descongelamento (ERIKSEN, 2008-b; SILVA, 2008; SARADA *et al*, 1999 e SILVEIRA, 2007).

- **Purificação**

O grau de pureza da ficocianina é obtido pela razão entre a absorbância de uma amostra do pigmento a 620 nm (A_{620}), proporcional à quantidade de pigmento, e a 280 nm (A_{280}), proporcional aos grupos amino presentes nas proteínas totais. As amostras de ficocianina com uma razão A_{620}/A_{280} maior que 0,7 são consideradas de grau alimentício. As amostras com a razão A_{620}/A_{280} de 3,9 são consideradas de grau reativo, enquanto valores superiores a 4,0 são consideradas de grau analítico. A precipitação com sulfato de amônio, combinada com uma variedade de princípios cromatográficos, foi empregada para obtenção de ficocianina com grau alimentício, reativo e analítico. A extração com duas fases aquosas seguidas de cromatografia de troca iônica foi recentemente relatada por apresentar ficocianina extremamente pura, com $A_{620}/A_{280} = 6,69$ (ERIKSEN, 2008-b; SILVA, 2008; SARADA *et al*, 1999 e SILVEIRA, 2007).

Na Figura 9 (A), pode-se observar a ficocianina diluída em solução aquosa, após passar por processo de purificação por precipitação com sulfato de amônio em escala laboratorial e outra característica é visualizada na Figura 9 (B): sua fluorescência. Sun *et al*, (2006) explica que esse fenômeno de fluorescência deve-se ao fato de que quando as ficobiliproteínas são isoladas e purificadas dos organismos, elas não possuem mais aceptores próximos para onde possam transferir a luz captada, que é então reemitida em comprimento de onda de 652nm.



Figura 9 – Ficocianina, após processo de purificação (A) e sua fluorescência característica (B).

Outra técnica aplicável na purificação da ficocianina baseia-se nos sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Silva (2006) relata que muitos trabalhos desenvolvidos a partir do final do século XX potencializaram o uso desses sistemas para a purificação de materiais biológicos, já que a água passou a ser empregada como solvente de ambas as fases em substituição aos solventes orgânicos, fornecendo assim um ambiente mais ameno para as biomoléculas e sem riscos de perda das suas atividades biológicas.

O mesmo autor salienta que a partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos (eletrólito/polímero) é resultado desses trabalhos pioneiros que demonstram o balanço de interações entre a proteína, os polímeros utilizados, água e sais inorgânicos presentes nas duas fases coexistentes. Outros fatores, como a natureza e concentração dos polímeros, o pH e a temperatura também influenciam nas interações moleculares e formação das fases.

Míreles *et al*, (2006) estudaram a purificação da B-Ficoeritrina combinando a Precipitação Isoelétrica com o SDFA formado a partir de um sistema polietilenoglicol-fosfato, ou simplesmente, PEG-fosfato e obtiveram pureza superior a 4.0, com rendimento de 72% nas condições estudadas.

2.1.4.5 Estabilidade da ficocianina

Estudos da estabilidade da ficocianina indicam que a ficocianina é estável numa faixa de pH entre 5 – 7,5, à temperatura de $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Sob temperaturas mais baixas, a ficocianina permanece estável por longos períodos. Abaixo ou acima da faixa de pH mencionada, o pigmento perde sua coloração gradualmente. O efeito da temperatura na estabilidade da ficocianina indica que ela é altamente instável a 40°C , ou mais e a ficocianina perde sua coloração a partir de 50°C . Constata-se que sob temperaturas acima de 30°C , ela gradualmente perde sua coloração e permanece estável por longos períodos quando armazenada entre 10 e 4°C (SARADA *et al*, 1999, SILVA, 2008).

Estudos realizados por Antelo *et al*, (2008) também demonstraram que a meia-vida da ficocianina decresce à medida que a temperatura eleva-se, principalmente quando supera os 50°C e a combinação de outro fator, no caso o pH = 5,0, pode acelerar drasticamente a degradação de sua cadeia protéica. Os mesmos autores indicam a utilização de sorbitol como um potente agente estabilizador capaz de elevar consideravelmente a meia-vida da ficocianina.

Os trabalhos demonstram que a utilização de biomassa fresca fornece melhores resultados em termos da ficocianina obtida, já que uma grande parte pode ser perdida nos métodos de secagem.

2.1.4.6 Aplicações da ficocianina

O interesse na ficocianina é uma consequência de suas características e algumas propriedades ainda em fase de prospecção, mas que apontam, sobretudo, para o estímulo ao sistema imunológico, o efeito redutor do colesterol, como anti-inflamatório, antiviral, anticâncer e principalmente, como um poderoso antioxidante (SPOLAORE *et al*, 2006; ESTRADA *et al*, 2001; BERMEJO *et al*, 2008; ERIKSEN, 2008-b). Por ser um poderoso e sensível reagente fluorescente, a ficocianina é ideal para marcação de anticorpos, receptores e outras moléculas ativadas para utilização em experimentos, diagnósticos e microscopia de fluorescência. (PROZYME, 2010-a; ERIKSEN, 2008-b).

Muitas pesquisas são realizadas para identificar e confirmar as propriedades benéficas da ficocianina. Souza *et al*, (2006) realizaram testes para avaliar o potencial antioxidante da ficocianina em azeite de soja e de oliva e concluíram que existe eficácia na prevenção da peroxidação lipídica, sendo capaz de minimizar danos celulares e a formação de radicais livres. Por outro lado, condicionaram sua eficácia ao tipo de molécula geradora do estresse oxidativo e à localização intra ou extracelular dessa molécula. Sabe-se que o grande número de insaturações e a capacidade da ficocianina em seqüestrar os radicais hidroxila estão diretamente relacionados ao seu potencial antioxidante.

Romay *et al*, (1998) também concluíram positivamente sua pesquisa sobre as propriedades antioxidante e anti-inflamatória da ficocianina, em ensaios comparativos com outras substâncias de potencial já conhecido. Padyana *et al*, (2001) e Pádula *et al*, (1996) também mencionam a utilização da ficocianina em terapias fotodinâmicas de vários tumores cancerosos.

O uso da ficocianina em alimentos encontra mercado em alguns países asiáticos e europeus e foi exemplificada por alguns autores, porém, seu uso para consumo humano ainda encontra restrições em grandes mercados, como os Estados Unidos. Empresas alimentícias de grande porte já testam a substituição de pigmentos sintéticos das gomas de mascar, sorvetes, balas, refrigerantes e outros produtos de consumo diário pela ficocianina, porém, a maior

limitação refere-se à escassa possibilidade de aplicação, já que alimentos azuis são pouco atrativos, além dos problemas relacionados com as propriedades reológicas desse pigmento e de sua estabilidade na interação com os alimentos. Isso acaba justificando as maiores possibilidades de aplicação da ficocianina em alimentos nutracêuticos com potencial antioxidante, ou ainda, na utilização da própria spirulina desidratada como o componente funcional (SPOLAORE *et al*, 2006; ESTRADA *et al*, 2001; BERMEJO *et al*, 2008; ERIKSEN, 2008-b). A ficocianina também ser empregada para fabricação de cosméticos e maquiagem (batons, lápis para olhos, etc.).

As condições de extração e purificação da ficocianina e do cultivo da *Spirulina* – geralmente em tanques abertos e com condições ambientais menos controladas – proporcionarão o sucesso, ou não, dos mecanismos de funcionamento que levam a todos os efeitos benéficos já relatados. Apesar desses mecanismos específicos não serem completamente compreendidos, alguns projetos como o da Antenna Technologies denominado Antenna Nutrition (Programa de produção e distribuição de Spirulina) destinam-se ao ensino das técnicas de cultivo em tanques abertos (Figura 10) de *Spirulina* em larga escala e com a finalidade de suprir demandas nutricionais de populações carentes de países subdesenvolvidos.



Figura 10 – Produção de *Spirulina platensis* em larga escala na cidade indiana de Madurai.
Fonte: Antenna Technologies (2010).

2.2 Micro-organismo de interesse: *Spirulina*

A *Spirulina* tem um conteúdo próximo a 62% de aminoácidos (base seca), alta presença de ácido γ -linolênico e é a fonte mais rica de vitamina B₁₂ já estudada, além de possuir um amplo espectro de pigmentos naturais como carotenóides, xantofilas e biliproteínas. A presença dessas ficobiliproteínas como a aloficocianina e a ficocianina favorecem a disseminação dos estudos com a *Spirulina* (PIÑERO ESTRADA, 2001, SCHELDEMAN *et al*, 1999).

2.2.1 Aspectos históricos e ocorrência natural

A primeira referência sobre o consabimento humano de microalgas foi relatada por um espanhol, frei Toribio de Benavente, que nas crônicas sobre a conquista do México relatou como os astecas colhiam com cestos uma espécie de limo verde que denominavam tecuitlatl e que crescia de forma espontânea e abundante em lagos alcalinos que rodeavam a atual Cidade do México. O tecuitlatl era composto por uma cianobactéria filamentosa que hoje é conhecida como *Spirulina maxima*. Frei Toribio de Benavente também foi o primeiro a descrever o sistema de processamento da *Spirulina*, que consistia na sua filtração e secagem em pequenos buracos na areia e na fabricação de tortas similares às preparadas com o milho. Expedições européias para a África Central também observaram a mesma técnica com *Spirulina platensis*, isolada do lago Chade (ULPGC, 2009).

As cianobactérias, grupo ao qual pertence a *Spirulina*, são o mais antigo grupo de micro-organismos fossilizados já encontrados na forma de estromatólitos¹, com uma idade aproximada de 3000 milhões de anos. Durante muito tempo, as atividades destas bactérias foram a principal manifestação da vida na Terra. Sua atividade fotossintética foi responsável pela transformação da atmosfera terrestre de redutora a oxidante, criando as condições para o surgimento de formas de vida mais complexas a partir do período Cambriano (LEE, 1989).

¹ Estromatólito: (do grego *stroma*=cama, camada e *lithos*=rocha). São estruturas laminadas construídas principalmente por cianobactérias. Essas bactérias formam uma rede filamentosa, recoberta por bainhas mucilaginosas, que fixam o carbonato de cálcio do meio circundante, construindo, pouco a pouco, uma estrutura laminar que se desenvolve através da agregação de grãos detríticos, cimentados pelo carbonato de cálcio. Estas estruturas laminares podem assumir a forma de esteiras microbianas, camadas, domos, colunas e oncólitos. (DICIONÁRIO LIVRE DE GEOCIÊNCIAS, 2011).

Trata-se de uma alga planctônica cianofícea, encontrada prioritariamente em regiões de clima tropical e subtropical, em corpos d'água aquecida, com alto conteúdo de carbonato e bicarbonato, salinidade e pH elevados. Além da ocorrência no México, diferentes cepas de *Spirulina* foram isoladas nos quatros continentes: África, Europa, Ásia e Américas.

2.2.2 Caracterização e morfologia da *Spirulina*

O gênero *Arthrospira* é filogeneticamente distinto da *Spirulina*, mas como o habitat e a forma helicoidal são semelhantes, habituou-se a utilizar ambos os termos para nomear essa cianobactéria filamentosa, bastante reconhecida pelas características morfológicas do gênero: arranjo dos seus tricomas cilíndricos multicelulares, com seções perpendiculares bastante visíveis e com formato helicoidal característico por toda a extensão dos filamentos. Os filamentos ou tricomas, envoltos numa espécie de capa, demonstram algumas constrições, comprimento próprio que varia de 2 a 10 μm e 5 a 6 μm de diâmetro, formando uma hélice que pode variar de 30 a 70 μm de raio num comprimento do filamento de aproximadamente 200 – 300 μm . A propósito, o formato helicoidal é bastante influenciado pelos fatores ambientais, tomando um aspecto espiralado principalmente em meio sólido (VONSHAK, 1997; SILVA, 2008; SPILLER *et al*, 2010).

Um estudo filogenético baseado na análise do DNA ribossomal realizado por Scheldeman *et al*, (1999) com linhagens clonais de *Arthrospira* (*Spirulina*), num total de 51 culturas testadas e obtidas de diferentes bancos de linhagens - isoladas de quatro continentes - mostrou a separação de todas as cepas em apenas dois grupos principais, sendo que nenhuma relação clara pode ser observada entre esta divisão em dois grupos e a origem geográfica dessas cepas (grupos diferentes no mesmo continente ou grupos iguais em continentes diferentes, possivelmente graças às aves migratórias que pousam nesses corpos d'água), ou a sua morfologia e designação nos bancos de linhagens. Sendo assim, cepas de *S. platensis*, por exemplo, puderam ser identificadas tanto num grupo quanto no outro, assim como cepas com características morfológicas diferentes puderam ser alocadas no mesmo grupo. Isso se deve à resposta morfológica da *Spirulina* frente aos diferentes aspectos ambientais, como por exemplo, o grau de espiralização e o aparecimento de tricomas em linha reta e indica a necessidade de uma revisão na taxonomia do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*).

A fissão binária de suas células vegetativas caracteriza sua reprodução, possuindo flutuação livre e uma estrutura celular típica de organismos procariontes, ou seja, com seu núcleo desprovido de membrana, sendo preenchida por citoplasma que contém grânulos de poliglicanos e vacúolos gasosos. Ainda podem ser encontradas fibrilas e pequenas porções lipídicas. As membranas tilacóides estão na região periférica e central do citoplasma, arranjadas paralelamente entre si e o sentido longitudinal do filamento. As áreas sem tilacóides, além da baixa densidade eletrônica, possuem ribossomos e fibrilas de DNA (VONSHAK, 1997). A membrana celular apresenta característica gram-negativa e é fina, o que facilita o seu rompimento, principalmente para a extração de pigmentos.

A Figura 11, a seguir, apresenta a micrografia da *Spirulina platensis*, com a presença de seus tricomas num sistema helicoidal contínuo, onde também é possível constatar as seções transversais que dividem os tricomas em células e a fina capa que os cobrem, na forma de sutis nervuras entrelaçadas.



Figura 11 – Imagem da *Spirulina platensis* obtida por microscopia eletrônica.

Fonte: VONSHAK (1997)

Nota: a barra representa 10 μm

A *Spirulina* geralmente apresenta um conteúdo proteico de aproximadamente 60 – 70% de sua massa seca, dependendo das condições ambientais do cultivo. Além disso, contém todos os aminoácidos essenciais e, embora com quantidades reduzidas de metionina, cistina e lisina (em relação as proteínas da carne, ovos ou leite), é superior a todas as proteínas vegetais, como as leguminosas (OLIVEIRA *et al*, 1999; DIC LIFETEC CO, 2009; PIÑERO ESTRADA,

2001; COLLA, 2004; HASH BIOTECH LABS, 2009 e JAPAN FOOD RESEARCH LABORATORIES, 2007).

As mesmas fontes apresentam uma série de outros componentes nutricionais presentes na biomassa de *Spirulina* (mais de 50), todas elas, condicionadas às melhores condições de cultivo, como por exemplo:

- Ácidos graxos: a *Spirulina* apresenta um bom índice de ácidos graxos poliinsaturados, cerca de 1.1 a 1.3% do seu percentual total de lipídios (5,5 - 8%, base seca). Segundo Colla *et al*, (2004), a ordem decrescente de ocorrência dos ácidos é: palmítico, linolênico, oléico, palmítico e esteárico;
- Vitaminas: a *Spirulina* contém vitamina B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina), B₉ (ácido fólico), B₁₂ (cianocobalamina), vitamina D, K e vitamina E;
- Minerais: potássio, cálcio, cromo, cobre, iodo, magnésio, manganês, fósforo, selênio, sódio e zinco;
- Pigmentos naturais, como clorofila-a, beta-caroteno, zeaxantina, ficocianina e aloficocianina.

Como benefícios para a saúde humana, além do valor protéico, são destacadas inúmeras possibilidades, mas principalmente seus efeitos sobre a melhoria no sistema imunológico, capacidade antioxidante, efeito anti-idade, melhoria no sistema circulatório, digestivo, dentre outras (PIÑERO ESTRADA, 2001, SCHELDEMAN *et al*, 1999).

2.2.3 Técnicas de cultivo

O desenvolvimento da espécie em estudo (*S. platensis*) e consequentemente a formação de biomassa com os produtos de interesse é resultado de determinadas transformações químicas que ocorrem nos ciclos que envolvem carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo, sob determinadas condições delimitadas pela etapa de cultivo.

Para a microalga *Spirulina platensis*, o meio de cultura mais utilizado é o descrito por Zarrouk (1966) – ver Tabela 7, porém, Reinehr (2001) utilizou-o diluído a 20% (v/v), obtendo desenvolvimento da *Spirulina* de forma mais estável. Nesse caso, o requerimento de carbono inicial é geralmente suprido através do Bicarbonato de Sódio presente no meio Zarrouk, seguido

pelo CO₂ que precisa ser alimentado de forma contínua ou intermitente ao fotobioreator (VONSHAK e RICHMOND, 1988).

Entretanto, além do alto requerimento de bicarbonato de sódio da *S. platensis* como fonte de carbono inicial, é preciso estar atento à manutenção da alcalinidade do meio, já que essa também é uma condição favorável para o crescimento da *Spirulina* (RAOOF, 2006).

Tabela 7 – Composição do meio Zarrouk.

Solução Macronutrientes		Solução A ₅ (mL)		Solução B ₆ (mL)	
Sal	g/1000mL	Sal	g/1000mL	Sal	g/1000mL
NaHCO ₃	18,0	H ₃ BO ₃	2,8600	NH ₄ VO ₃	0,0229
K ₂ HPO ₄	0,5	MnCl ₂ 4H ₂ O	1,8100	K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ ·24H ₂ O	0,0960
NaNO ₃	2,5	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,2200	NiSO ₄ ·7H ₂ O	0,0478
K ₂ SO ₄	1,0	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0800	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,0179
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	MoO ₃	0,0100	Ti(SO ₄) ₃	0,0400
NaCl	1,0			Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0044
CaCl ₂	0,0400				
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0100				
EDTA	0,08				
Solução A ₅ (mL)	1,0				
Solução B ₆ (mL)	1,0				

Fonte: Zarrouk (1966)

Lee (2001) estudou os diferentes tipos de reatores para cultivo e concluiu que para sistemas abertos, a melhor forma de manter uma monocultura microalgal é a manutenção de suas características ambientais ideais, tais como salinidade, alcalinidade e alto *status* nutricional do meio de cultivo. Em sistemas fechados e grandes volumes, o crescimento algal é otimizado, porém, a posterior esterilização por aquecimento pode ser prejudicada pela existência de biofilmes. Nesse caso, a aplicação de agentes químicos pode ser eficaz, mas colocará em risco sua aplicação para consumo como produto alimentício ou farmacêutico. O mesmo autor relacionou altas produtividades obtidas na produção de *S. platensis* em reatores de placas planas inclinadas.

2.2.3.1 Meios Alternativos de Cultivo

Diversos estudos tem demonstrado que as microalgas – em especial a *Spirulina* – podem crescer empregando rotas nutricionais alternativas à “tradicional” obtenção de carbono a partir

do dióxido de carbono atmosférico. Sendo assim, compostos orgânicos oriundos dos mais variados substratos, principalmente na forma de alguns tipos de resíduos e efluentes industriais, encontram aplicação. No caso da *S. platensis*, o cultivo pode ser fotoautotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. Porém, como já testado por Zhang *et al*, (1999-a), uma cultura mixotrófica ou heterotrófica pode não produzir os resultados esperados em termos de crescimento celular e produção de ficocianina devido às concentrações de carbono orgânico presentes ou à baixa luminosidade provocada por uma maior turbidez no meio de cultivo.

Em alguns sistemas de cultivo aberto, fontes de carbono orgânico, como o acetato, glicerol ou glicose são adicionadas para servir como substrato. Geralmente as quantidades são pequenas e adicionadas de forma contínua, como forma de inibir um crescimento bacteriano excessivo. A adição de carbono orgânico também deve ser suspensa à noite, pois neste caso as bactérias competiriam com o desenvolvimento heterotrófico da alga. Conforme apresentado anteriormente na Tabela 3, o cultivo mixotrófico da *S. platensis* apresentou rendimento ligeiramente inferior ao fototrófico (LEE, 2001).

Bertolin *et al*, (2005) utilizou para os ensaios laboratoriais o efluente sintético de suíno proposto por Bergmann *et al*, (2000), e com composição descrita na Tabela 8. A vantagem de se utilizar efluente sintético é a composição definida e a conseqüente repetibilidade dos ensaios para estudos do comportamento do micro-organismo. A utilização de efluente *in natura* prejudica os trabalhos experimentais em sua fase inicial, pois pode apresentar sazonalidade com relação à composição química.

Muñoz e Guieysse (2006) ressaltam que a utilização de águas residuárias e outros poluentes são fatores extremamente limitantes ao crescimento de microalgas, principalmente sob altas concentrações de NH_3^+ e pH elevado. Por outro lado, um processo de seleção de cepas, aclimação a altas concentrações de poluente ou o isolamento de micro-organismos pré-existente naquele meio, pode apresentar melhores resultados.

Tabela 8 – Composição do efluente sintético de suínos.

Componente	Concentração	Componente	Concentração
NaHCO ₃	0,600 g/L	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,0135 g/L
K ₂ HPO ₄	0,500 g/L	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,005 g/L
NaNO ₃	0,001 g/L	MoO ₃	0,00003 g/L
K ₂ SO ₄	0,400 g/L	Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	0,0001 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,400 g/L	NH ₄ OH	0,420 mL/L
CaCl ₂	0,500 g/L	NH ₄ Cl	0,668 g/L
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,400 g/L	EDTA	0,100 g/L
H ₃ BO ₄	0,500 g/L	Na ₂ SO ₄	0,600 g/L
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,003 g/L		

Fonte: BERTOLIN *et al*, (2005).

Considerando os resultados positivos obtidos para o cultivo da microalga *S. platensis* em fontes alternativas de nutrientes, tais como o melaço (ANDRADE e COSTA, 2008), efluente sintético de suínos (BERTOLIN *et al*, 2005), remoção de nutrientes e polimento final de efluentes de suínos (OLGUÍN *et al*, 2003), tratamento de contaminantes perigosos (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006), dentre outros, destaca-se a também a necessidade de maiores estudos relacionados às implicações dessas fontes alternativas na produtividade e qualidade da ficocianina obtida.

2.2.3.2 Avaliação do crescimento

A avaliação do crescimento algal em termos de biomassa pode ser feita através da determinação, em triplicata, da medida do peso seco obtido após sua estabilização a 105°C, medida de turbidimetria a 670 nm e aplicação um fator de correção para o peso seco (MORIST, *et al*, 2001). A velocidade específica de crescimento μ (d⁻¹) é avaliada por um modelo de regressão polinomial e relacionando os valores experimentais de biomassa em função do tempo (d), em dias. O cálculo da produtividade é a razão entre a diferença da biomassa num dado período e o próprio período.

2.3 Técnicas de preservação das cepas de interesse

A preservação é essencial na pesquisa com micro-organismos uma vez que é ela quem garante a boa conservação e viabilidade das cepas utilizadas na experimentação. Por outro

lado, a preservação de alguns micro-organismos, especialmente a *Spirulina* por longos períodos é difícil de ser atingida em níveis satisfatórios, exigindo a utilização de crioprotetores, além de algumas técnicas preparatórias, já descritas por Andersen (2005), Ben-Amotz e Gilboa (1980) e Gualtieri e Barsanti (2006).

Alguns detalhes precisam ser observados para garantir o sucesso na preservação de espécies microalgais. Normalmente o desenvolvimento de um processo que proporcione estabilidade às células por longos períodos é crítico. Adicionalmente, um método de preservação deve ser simples e barato, não exigindo equipamentos sofisticados, além de garantir rápida implementação com alta viabilidade celular pós-preservação.

Os métodos para preservação de microalgas utilizam grandes populações de células isoladas e geralmente um agente crioprotetor é adicionado como forma de minimizar as injúrias durante o congelamento e descongelamento. Esses danos não são totalmente compreendidos, mas provavelmente tem origem na formação de gelo intracelular, estresse osmótico e ainda do surgimento de radicais livres. Por tais motivos, um crioprotetor em concentração adequada deve ser adicionado (ANDERSEN, 2005).

O mesmo autor explica que a formação de gelo intracelular, proporciona mudanças volumétricas nas células, bem como outros efeitos são influenciados pela velocidade de congelamento, adição de crioprotetores e a temperatura de nucleação do gelo. Já a água solidificada sob temperaturas inferiores a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ não sofre alterações de estado, portanto abaixo dessa temperatura a recristalização do gelo pode ser descartada. O armazenamento contínuo acima dessa temperatura, que é considerada a temperatura vítrea de transição ou a temperatura de transformação vítrea (T_g), é considerada crítica para a criopreservação de organismos por longos períodos em meios aquosos.

Com relação aos crioprotetores, os agentes penetrantes são geralmente escolhidos porque aparentemente funcionam prevenindo a perda de água por osmose (pelo aumento da concentração intracelular) e ainda reduzindo a desidratação celular para níveis aceitáveis. A penetração nas células deve ser uniforme e alcançada sem a imposição de estresse osmótico, o que pode ser destrutivo. Particularmente, as virtudes do DMSO, etanol e metanol são a velocidade e aparente universalidade de sua penetração. O maior defeito do glicerol é o seu movimento lento através das membranas celulares e a grande quantidade de tecidos que

aparentam ser virtualmente impermeáveis. Outro obstáculo é a toxicidade dos agentes penetrantes nas altas concentrações necessárias para se atingir a proteção (MERYMAN, 1971).

O sucesso de um método de preservação pode ser avaliado de muitas formas. Quantitativamente, pode ser medido como um percentual de viabilidade (a porção de células que permanece viável após o descongelamento). O sucesso mínimo pode ser definido através da recuperação de ao menos um organismo algal vivo, embora na prática, padrões mais rigorosos sejam requeridos (ANDERSEN, 2005). Viabilidades superiores a 60% são recomendadas como um padrão de culturas microalgais criopreservadas e mantidas na Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (MORRIS, 1981).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados são cepas de *Spirulina platensis* (cepas PAR e LEB-52) utilizadas há alguns anos no Laboratório de Engenharia de Microalgas (Universidade Federal do Paraná - UFPR) e originalmente fornecidas pelo prof. Jorge A. V. Costa (Universidade Federal do Rio Grande - FURG). Essas microalgas são mantidas rotineiramente por cultivos sucessivos em meio Zarrouk e foram reativadas e inoculadas inicialmente em placas de Petri com meio ES (sólido), além de fotobioreatores previamente preparados com meio Zarrouk. Após essa fase inicial, iniciou-se o processo de manutenção das culturas, instrumentação e pré-testes, bem como a fase de desenvolvimento e testagem.

Apesar de a *Spirulina* ser o micro-organismo de interesse neste trabalho, também foram realizados cultivos com a microalga *Chlorella vulgaris*, obtida a partir de um banco de linhagens (SAG), a qual é mantida por cultivos sucessivos em meio ES.

A escolha desses microrganismos recai na facilidade de acesso a eles e aos estudos previamente realizados com as mesmas cepas.

3.2 Meios de Cultivo

O início do desenvolvimento experimental com ambas as cepas de *Spirulina platensis* envolveu a formulação de meio de cultura padronizado – Zarrouk. Todo material foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, exceto alguns ensaios que também foram conduzidos com material e meios de cultivo não esterilizados como forma de estudos preliminares ou para reproduzir as condições reais de cultivo. Os cultivos foram realizados nos meios de cultivo descritos a seguir, porém, cabe ressaltar que em algumas dessas situações a cinética de crescimento não foi estudada, já que os estudos preliminares não apontaram um bom desenvolvimento das culturas:

- Zarrouk a 100% v/v, esterilizado (ZARROUK, 1966);

Zarrouk diluído a 20% v/v, esterilizado e não esterilizado (ZARROUK, 1966 e REINEHR, 2001);

- Efluente sintético de suíno esterilizado e diluído a 10%, 20% e 30% v/v (BERTOLIN, 2005);
- Efluente primário de pocilga (criadouro de suínos) localizada em Curitiba/PR, *in natura*, diluído a 5%, 10%, 15% e 20% v/v;
- Efluente terciário (ou seja, da etapa final de tratamento) de indústria processadora de produtos cárneos localizada em Montenegro/RS, *in natura*, diluído a 10% v/v. As características principais desse efluente são: pH = 7,5; $\text{DBO}_{5 \text{ dias}} = 70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{DQO} = 205 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $F_{\text{total}} = 18,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $N_{\text{total}} = 138,63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Sólidos suspensos = $68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e Coliformes termotolerantes ($\text{NMP}\cdot\text{mL}^{-1}$) = 5000;
- Efluente terciário (caracterizado anteriormente), de indústria processadora de produtos cárneos localizada em Montenegro/RS, *in natura*, diluído a 10% v/v e adicionado de uma fonte de carbono inorgânico ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio);
- Efluente terciário (caracterizado anteriormente) de indústria processadora de produtos cárneos localizada em Montenegro/RS, *in natura*, diluído a 10% v/v e adicionado de uma fonte de nitrogênio inorgânico ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato de sódio);
- Manipueira², obtida de indústria processadora de mandioca localizada em Paranaíba/PR, utilizado nas seguintes condições: manipueira bruta, não esterilizada; manipueira bruta, esterilizada; manipueira filtrada, não esterilizada e manipueira filtrada, esterilizada;
- Zarrouk a 20% v/v e adição, a cada quatro dias, de 50 mL de manipueira (obtida de indústria processadora de mandioca localizada em Paranaíba/PR) bruta e esterilizada;
- Zarrouk a 20% v/v e adição, a cada quatro dias, de 50 mL de manipueira (obtida de indústria processadora de mandioca localizada em Paranaíba/PR) filtrada e esterilizada;
- Zarrouk a 20% v/v e adição, diária, de 50 mL de manipueira (obtida de indústria processadora de mandioca localizada em Paranaíba/PR) filtrada e não esterilizada;

² A manipueira, ou tucupi, é o líquido residual de aspecto leitoso e cor amarelo-claro gerado na prensagem da massa ralada de mandioca (*Manihot esculenta*) e que apresenta em sua composição macro e micronutrientes como o fósforo, o potássio, magnésio e cálcio, além de duas substâncias altamente tóxicas: o cianeto e o ácido cianídrico. Trata-se de um resíduo agroindustrial que atualmente possui pouco ou nenhum aproveitamento, sendo costumeiramente despejado no solo e nos cursos d'água sem nenhum tratamento prévio (NASU, 2008; EMBRAPA, 2011).

O desenvolvimento experimental com a microalga *Chlorella vulgaris* foi baseado nos seguintes meios de cultivo:

- Meio ES a 100% v/v, esterilizado (SAG, 2010);
- Meio ES a 100% v/v e adição, a cada quatro dias, de 50 mL de manipueira (obtida de indústria processadora de mandioca localizada em Paranavaí/PR) bruta e esterilizada;
- Meio ES a 100% v/v e adição, a cada quatro dias, de 50 mL de manipueira (obtida de indústria processadora de mandioca localizada em Paranavaí/PR) filtrada e esterilizada;

A utilização de meios de cultivo, por vezes não esterilizados, visa à obtenção de comparativos da cultura microalgal entre as condições onde a influência de contaminantes microbiológicos é mínima ou inexistente e aquelas onde há presença desses contaminantes. Esses meios foram mantidos congelados (-18°C) até sua completa utilização.

3.3 Condições de cultivo

A inoculação em diferentes tipos de fotobioreatores foi realizada sob variados parâmetros ambientais, como forma de testar o desenvolvimento da biomassa e a produção do produto de interesse. A disposição de fotobioreatores tanto em ambiente controlado quanto em ambiente externo, visam traçar comparativos entre as condições ambientais ideais e aquelas que refletem as condições reais num processo produtivo.

O pH de cultivo das cepas de *Spirulina platensis* corresponde ao pH do meio Zarrouk, ou seja, está no intervalo entre 8,5 e 9,5. Em todas as demais condições descritas no item 3.2 e para as quais não se utiliza o meio Zarrouk padrão, o pH foi ajustado com solução de NaOH 10% v/v até a faixa compreendida entre 8,5 e 9,5.

Se combinarmos os diferentes meios de cultivo com as condições de cultivo, haverá uma série de possibilidades de manejo das microalgas em estudo. Portanto, cultivos preliminares foram realizados no sentido de delimitar os estudos em onze cinéticas de crescimento assim estabelecidas:

- Cinética 01 – *Spirulina platensis* PAR e *Spirulina platensis* LEB-52 cultivadas em Meio Zarrouk a 20% v/v, esterilizado, em frascos Erlenmeyer de 2,0 L na sala do Laboratório

de Engenharia de Microalgas (UFPR), com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 0,8 klux) em ciclos 12:12 h, volume de cultivo inicial de 1,0 L e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

- Cinética 02 - *Spirulina platensis* PAR cultivada em triplicata: Meio Zarrouk a 20% v/v, esterilizado, em frascos Erlenmeyer de 2,0 L, na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR) com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 0,8 klux) em ciclos 12:12 h, volume de cultivo inicial de 1,0 L e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Realizada a retirada de amostras a cada 48 horas para verificação do crescimento celular e alíquota de 5 mL para verificação da evolução na produção de ficocianina;
- Cinética 03 - *Spirulina platensis* PAR cultivada em meio Zarrouk a 20% v/v, não esterilizado, em tanques plásticos com capacidade de 80 L e volume inicial de 40 L de meio de cultivo, cobertos com filmes nas cores amarelo, azul, vermelho e padrão (sem filtro), conforme Figura 12. Estufa agrícola localizada em ambiente externo (UFPR), sujeita aos ciclos de iluminação natural com intensidade média de 1,7 klux, bem como $T_{\text{media}} = 24,3^\circ\text{C}$ e com aeração forçada (borbulhamento de ar de $600 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) por meio de bomba de diafragma;



Figura 12 – Aspecto dos fotobioreatores em ambiente externo, cobertos com filme colorido.

- Cinética 04 - *Spirulina platensis* LEB-52 cultivada em meio Zarrouk a 20% v/v, esterilizado, em tubos de cultura celular de 0,2 L cobertos com filmes coloridos (verde, vermelho, amarelo, azul e padrão) sem aeração na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR) com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 1,2 klux sobre os filtros) e ciclos 12:12 h;
- Cinética 05 - *Spirulina platensis* PAR cultivada em meio Zarrouk a 20% v/v, esterilizado, em tubos de cultura celular de 0,2 L cobertos com filmes coloridos (verde, vermelho, amarelo, azul e padrão) sem aeração e em câmara de cultivo com agitação (*shaker*), ambiente climatizado, com temperatura de 30 ± 2 °C e iluminação influenciada pela luz ambiente (tanto natural quanto artificial), em ciclos luz/escuro 11:13 h com intensidade média de 1,0 klux sobre os filtros, na Usina Piloto B (UFPR);
- Cinética 06 - *Spirulina platensis* PAR cultivada em meio Zarrouk a 20% v/v, não esterilizado (padrão de comparação) e também em efluente primário de pocilga (criadouro de suínos) localizada em Curitiba/PR, *in natura* e diluído a 5%, 10%, 15% e 20%. Cultivo em tanques plásticos com capacidade de 80 L e volume inicial de 40 L de meio de cultivo na estufa agrícola localizada em ambiente externo (UFPR), sujeita aos ciclos de iluminação natural com intensidade máxima de 10 klux e média de 2 klux no período de cultivo, $T_{\text{média}} = 25,4^{\circ}\text{C}$, adição de Bicarbonato de Sódio ($3,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e com aeração forçada (borbulhamento de ar de $600 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) por meio de bomba de diafragma.
- Cinética 07 - *Spirulina platensis* LEB-52 cultivada em: efluente sintético de suíno a 10% v/v (padrão de comparação), efluente terciário *in natura* e diluído a 10% v/v, de indústria processadora de produtos cárneos localizada em Montenegro/RS, efluente terciário diluído a 10% e adicionado de uma fonte de Carbono inorgânico ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bicarbonato de Sódio) e efluente terciário diluído a 10% e adicionado de uma fonte de Nitrogênio inorgânico ($1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Nitrato de Sódio), todas em frascos Erlenmeyer de 2,0 L, na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR) com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 0,8 klux) em ciclos 12:12 h e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;

- Cinética 08 - *Spirulina platensis* PAR inoculada em três fotobioreatores (frascos Erlenmeyer de 2,0 L) na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR), com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 0,8 klux) em ciclos 12:12 h, aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e volume inicial de 1000 mL (meio Zarrouk 20% esterilizado e 10% de inóculo), sendo adicionada gradualmente manipueira bruta esterilizada e manipueira filtrada esterilizada nos fotobioreatores 01 e 02, respectivamente, e meio Zarrouk a 20% no fotobioreator 03 (padrão). A cada quatro dias uma amostra de 50 mL de cada um dos fotobioreatores foi coletada e, uma nova porção de manipueira bruta, manipueira filtrada e Zarrouk 20%, previamente fracionada (em frascos com 50 mL), esterilizada, congelada a -20°C e descongelada sob refrigeração foi adicionada no respectivo fotobioreator.
- Cinética 09 – *Chlorella vulgaris* inoculada em três fotobioreatores (frascos Erlenmeyer de 2,0 L) na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR), com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 0,8 klux) em ciclos 12:12 h e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ com volume inicial de 1000 mL (meio ES esterilizado e 10% de inóculo), sendo adicionada gradualmente manipueira bruta esterilizada e manipueira filtrada esterilizada nos fotobioreatores 01 e 02, respectivamente, e meio ES no fotobioreator 03 (padrão). A cada quatro dias uma amostra de 50 mL de cada um dos fotobioreatores foi coletada e, uma nova porção de manipueira bruta, manipueira filtrada e meio ES, previamente fracionada (em frascos com 50 mL), esterilizada, congelada a -20°C e descongelada sob refrigeração foi adicionada no respectivo fotobioreator.
- Cinética 10 - *Spirulina platensis* PAR inoculada em um fotobioreator (frasco Erlenmeyer de 2,0 L) na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR), com ambiente climatizado à temperatura de 30 ± 2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 1,2 klux) em ciclos 12:12 h e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ com volume inicial de 1000 mL (meio Zarrouk 20% esterilizado e 10% de inóculo), sendo adicionada gradualmente manipueira filtrada e não esterilizada. Diariamente uma amostra de 50 mL do fotobioreator foi coletada e, uma nova porção de manipueira filtrada não esterilizada, previamente

fracionada (em frascos com 50 mL), congelada a -20°C e descongelada sob refrigeração foi adicionada no fotobioreator.

- Cinética 11 – *Chlorella vulgaris* inoculada em um fotobioreator (frasco Erlenmeyer de 2,0 L) na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR), com ambiente climatizado à temperatura de 30±2 °C, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 1,2 klux) em ciclos 12:12 h e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar de 300 mL.min⁻¹) com volume inicial de 1000 mL (meio ES e 10% de inóculo), sendo adicionada gradualmente manipueira filtrada e não esterilizada. Diariamente uma amostra de 50 mL do fotobioreator foi coletada e, uma nova porção de manipueira filtrada não esterilizada previamente fracionada (em frascos com 50 mL), congelada a -20°C e descongelada sob refrigeração foi adicionada no fotobioreator.

3.4 Métodos Analíticos

Em todos os fotobioreatores realizam-se medições e leituras das condições operacionais (pH, temperatura, absorvância, densidade luminosa) com o objetivo de identificar as diferentes fases desenvolvimento da cultura e os melhores parâmetros de processo.

• Biomassa

A determinação da biomassa foi realizada retirando-se amostras periódicas e com intervalo de tempo pré-determinado, para a análise da turbidez e cálculo da biomassa. A análise da absorvância, conforme Silva (2008) e Reinehr (2001) foi feita no comprimento de onda de 670 nm, utilizando-se espectrofotômetro.

O cálculo da biomassa é realizado com base em uma correlação da biomassa seca, a equação resultante da curva de calibração e a os valores encontrados com a leitura da absorvância. Para cada cinética foi realizada uma curva de calibração.

Já o cálculo da produtividade pode ser realizado a partir da equação 1, a seguir:

$$P = (X_i - X_0)/t_i \quad (1)$$

Onde:

P = produtividade ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$);

X_0 = biomassa inicial ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);

X_i = biomassa no tempo i ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e

t_i = intervalo de tempo (dia) entre X_0 e X_i .

A velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) foi avaliada através de um modelo de regressão polinomial utilizando o software Microsoft Excel 2007, relacionando os valores experimentais de biomassa em função do tempo (d). A equação 2, a seguir, expressa esta velocidade:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

onde:

μ = velocidade específica (d^{-1})

t = tempo de crescimento (dia) e

X = biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.4.1 Extração do pigmento

A separação da biomassa para a posterior extração do pigmento é resultado da centrifugação do meio de cultivo líquido em tubos Falcon por quinze minutos a 10.000 rpm (7800 x g). Dando sequência ao procedimento já descrito no item 2.1.4.4, remove-se o sobrenadante e com a biomassa sedimentada é iniciada a extração do produto de interesse (ficocianina), que envolve a combinação de dois procedimentos: adição de tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0, seguido por cinco ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento da biomassa, visando ao rompimento das paredes celulares e o extravasamento das ficobiliproteínas. Lembrando que o congelamento durava 24 horas. Procede-se uma nova centrifugação, desta vez por dez minutos a 10.000 rpm (7800 x g) com a finalidade de sedimentar as células rompidas (debris). O sobrenadante, onde está a ficocianina, foi coletado para então iniciar-se a etapa de purificação da ficocianina, que envolveu a adição de solução saturada de sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ até 70% v/v, repouso por 48 h na ausência de luz e a 4 °C e finalmente

uma nova centrifugação a 9000 rpm (6300 x g) durante 30 minutos. (MINKOVA *et al*, 2003; PATEL *et al*, 2005; Silva, 2008).

Testes com diferentes concentrações de poliacrilamidas sintéticas de alto peso molecular, alta carga catiônica e baixa ordem de toxicidade oral (Magnafloc 7995 e Zetag 8185, da Ciba Specialty Chemicals) também foram realizados com a finalidade de precipitar a biomassa microalgal com maior rapidez e menor custo operacional. Todos os testes foram conduzidos à mesma temperatura (22°C) e com os floculantes concentrados a 1,0 mg·L⁻¹, 2,0 mg·L⁻¹ e 3,0 mg·L⁻¹. A cultura empregada nos testes foi de *Spirulina platensis* PAR cultivada em meio Zarrouk (20% v/v) com biomassa de 0,6 g·L⁻¹.

Também foi realizado um ensaio de rompimento celular de *Spirulina platensis* PAR em equipamento mecânico homogeneizador de alta pressão, para a determinação da curva de dano x pressão aplicada pelo equipamento, através da retirada de amostras processadas a várias pressões. Essas amostras foram analisadas por microscopia, imediatamente após o rompimento, e o sobrenadante (após centrifugação a 7800 x g) analisado em espectrofotômetro em três comprimentos de onda (para determinação da ficocianina e seu grau de pureza). Para efeitos de comparação, realizou-se a extração de ficocianina pelo método tradicional. A temperatura de rompimento foi de 24°C e com a sobra das diferentes pressões, foi realizado um "pool" e reprocessado em um novo passe no homogeneizador a 300 atm.

3.4.2 Purificação do pigmento

A concentração do pigmento foi realizada inicialmente através da adição de diferentes volumes de uma solução saturada de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) numa proporção que variou entre 20 e 70 % (v/v) de solução saturada adicionada. Após a adição dessa solução, era necessário repouso durante 48 horas para então realizar uma nova centrifugação, dessa vez a 9000 rpm (6300 x g) durante trinta minutos. O material precipitado pode ser diluído em tampão fosfato para a leitura da absorbância e quantificação, conforme definição de Bennett e Bogorad (1973), apresentada na equação 3:

$$FC = \frac{A_{620} - 0,474(A_{652})}{5,34} \quad (3)$$

Onde:

FC = concentração de ficocianina (mg.mL⁻¹);
 A₆₂₀ = absorbância a 620 nm.
 A₆₅₂ = absorbância a 652 nm.

Através das equações 4 e 5, é possível determinar as concentrações de aloficocianina e de ficoeritrina, respectivamente, conforme os mesmos autores:

$$AFC = \frac{A_{652} - 0,208(A_{620})}{5,09} \quad (4)$$

Onde:
 AFC = concentração de aloficocianina (mg.mL⁻¹);
 A₆₂₀ = absorbância a 620 nm.
 A₆₅₂ = absorbância a 652 nm.

$$FE = \frac{A_{562} - 2,41(FC) - 0,849(APC)}{9,62} \quad (5)$$

Onde:
 FE = concentração de ficoeritrina (mg.mL⁻¹);
 FC = concentração de ficocianina (mg.mL⁻¹);
 AFC = concentração de aloficocianina (mg.mL⁻¹);
 A₅₆₂ = absorbância a 562 nm.

Com o objetivo de realizar e analisar uma etapa complementar de purificação através do sistema de duas fases aquosas (SDFA), uma amostra de ficocianina concentrada a partir de solução saturada de sulfato de amônio foi previamente dialisada em membrana de celulose 76 mm (Sigma Aldrich) em solução tampão acetato de amônio 15 mM com pH 7, sob agitação branda a 4°C. A amostra foi mantida durante 24 horas a 4°C, com trocas da solução tampão durante o processo.

O SDFA foi realizado com temperatura de 22,9 °C, seguiu o planejamento fatorial 2⁴ e, com base em trabalhos previamente realizados por Míreles *et al*, (2006) e Benavides & Palomares (2004), foram estabelecidas as seguintes condições dos sistemas PEG (Polietileno-glicol)/fostafo, descritas na Tabela 9:

Tabela 9 – Planejamento fatorial 2⁴ com as condições definidas para o estudo de purificação através do SDFA.

Sistemas					Massa (g) para sistema de 5g				
Experimento	MM _{PEG}	C _{PEG}	pH	C _{Fosfato}	PEG	Sol. Fosfato	Amostra	H ₂ O	Amostra + H ₂ O
1	1000	21	6	10	1,05	1,25	1,0	1,7	2,7
2	3000	21	6	10	1,05	1,25	1,0	1,7	2,7
3	1000	25	6	10	1,25	1,25	1,0	1,5	2,5
4	3000	25	6	10	1,25	1,25	1,0	1,5	2,5
5	1000	21	8	10	1,05	1,25	1,0	1,7	2,7
6	3000	21	8	10	1,05	1,25	1,0	1,7	2,7
7	1000	25	8	10	1,25	1,25	1,0	1,5	2,5
8	3000	25	8	10	1,25	1,25	1,0	1,5	2,5
9	1000	21	6	14	1,05	1,75	1,0	1,2	2,2
10	3000	21	6	14	1,05	1,75	1,0	1,2	2,2
11	1000	25	6	14	1,25	1,75	1,0	1,0	2,0
12	3000	25	6	14	1,25	1,75	1,0	1,0	2,0
13	1000	21	8	14	1,05	1,75	1,0	1,2	2,2
14	3000	21	8	14	1,05	1,75	1,0	1,2	2,2
15	1000	25	8	14	1,25	1,75	1,0	1,0	2,0
16	3000	25	8	14	1,25	1,75	1,0	1,0	2,0
17	1500	23	7	12	1,15	1,5	1,0	1,4	2,4
18	1500	23	7	12	1,15	1,5	1,0	1,4	2,4
19	1500	23	7	12	1,15	1,5	1,0	1,4	2,4
20	1500	23	7	12	1,15	1,5	1,0	1,4	2,4

Onde: MM_{PEG} = massa molar do PEG (Sigma); C_{PEG} = concentração do PEG (base 100) e C_{Fosfato} = concentração do fosfatos (base 100).

As soluções de fosfatos, com o pH correspondente, foram previamente preparadas (solução 40% m/m) utilizando a relação descrita na Tabela 10:

Tabela 10 – Relação entre os sais de fosfato utilizados para uma solução 40% (m/m).

Sal	pH		
	6,0	7,0	8,0
H ₂ HPO ₄	-	24,39 g	37,73 g
KH ₂ PO ₄	-	15,61 g	2,27 g
Na ₂ HPO ₄	4,92 g	-	-
NaH ₂ PO ₄	35,08 g	-	-
H ₂ O	60,00 g	60,00 g	60,00 g

No caso SDFA, todos os sistemas tiveram seus resultados analisados com base no volume formado nas fases superior e inferior (*top* e *bottom*, respectivamente), assim como a quantificação proteica total através do método Bradford (1976) para cada uma das fases

formadas. A determinação através desse método poderia sofrer interferências com a absorbância do pigmento, pois os comprimentos de onda estão próximos (595 nm para o método Bradford e 620 nm para a ficocianina), portanto, é importante garantir a total ausência de interferentes químicos ou físicos no reativo, de forma a manter sua tonalidade castanho-escuro.

Os pigmentos ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram quantificados através das equações 3, 4 e 5, apresentadas anteriormente. O fator de purificação foi determinado a partir da relação entre a concentração de pigmento obtida na fase *top*, e a concentração do pigmento antes de submetê-lo ao SDFA.

3.4.3 Ensaios de criopreservação

O estudo das técnicas de preservação da microalga *Spirulina platensis* foi realizado com a utilização de DMSO como agente crioprotetor. Inicialmente, a cultura a ser preservada foi retirada do fotobioreator após 15 dias de cultivo em meio Zarrouk e concentrada até consistência pastosa através de centrifugação do meio de cultivo em tubos falcon previamente esterilizados e calibrados em câmara de fluxo laminar. A centrifugação foi conduzida a 10.000 rpm (7800 x g), durante 15 minutos e a 5 °C. O sobrenadante foi retirado e a biomassa precipitada foi ressuspensa com apenas uma alíquota (10 mL do volume de sobrenadante resultante), de onde foram então recolhidas cinco amostras de 1,8 mL para o congelamento e outra amostra de 1,8 mL para controle, nas condições descritas na a seguir:

- Controle: amostra inoculada em 50 mL de meio Zarrouk.
- Condição 01: adição de 0,2 mL (10%, v/v) de DMSO na amostra e congelamento em eppendorf a -18° C;
- Condição 02: adição de 0,2 mL (10%, v/v) de DMSO na amostra e congelamento em eppendorf a -80° C;
- Condição 03: adição de 0,2 mL (10%, v/v) de DMSO na amostra e congelamento em eppendorf a -196° C;
- Condição 04: adição de 0,2 mL (10%, v/v) de DMSO na amostra, congelamento em eppendorf a -18° C e após 24 horas, transferência para ambiente a -80° C;

- Condição 05: adição de 0,2 mL (10%, v/v) de DMSO na amostra, congelamento em eppendorf a -80° C e após 24 horas, transferência para ambiente a -196° C;

A amostra controle e as amostras das condições 01 a 05, após o período de congelamento, foram lançadas (1,8 mL de inóculo) em meios de cultivo idênticos (50 mL de meio Zarrouk) e tiveram suas células viáveis verificadas e contadas através de um método alternativo ao realizado em câmara de Neubauer, onde a viabilidade foi dada pela contagem em microscópio dos tricomas íntegros existentes num volume conhecido, obtido com auxílio de uma micropipeta. Após essa primeira contagem, todos os fotobioreatores foram colocados em bandeja agitadora, sob iluminação natural e temperatura de 30° C.

Decorridos doze dias, as culturas foram quantificadas pelo mesmo método de contagem e em seguida transferidas para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 670 nm de cada cultivo. As condições ambientais, já descritas, foram mantidas e, novamente após doze dias, houve nova leitura para quantificação e posterior transferência das culturas para frascos maiores com 400 mL do mesmo meio líquido. Foi realizada, no início e no final dessa etapa, a quantificação da biomassa por gravimetria,

Juntamente com o experimento de criopreservação, foi desenvolvido um estudo de relação entre os resultados do método alternativo de contagem das células aparentemente viáveis, leituras de absorbância e gravimetria. Para isso, foi inoculado e acompanhado por quatro semanas um fotobioreator com 540 mL de meio Zarrouk, adicionado de 60 mL de inóculo de *Spirulina platensis* PAR. O fluxograma com a técnica experimental utilizada está representado na Figura 13.

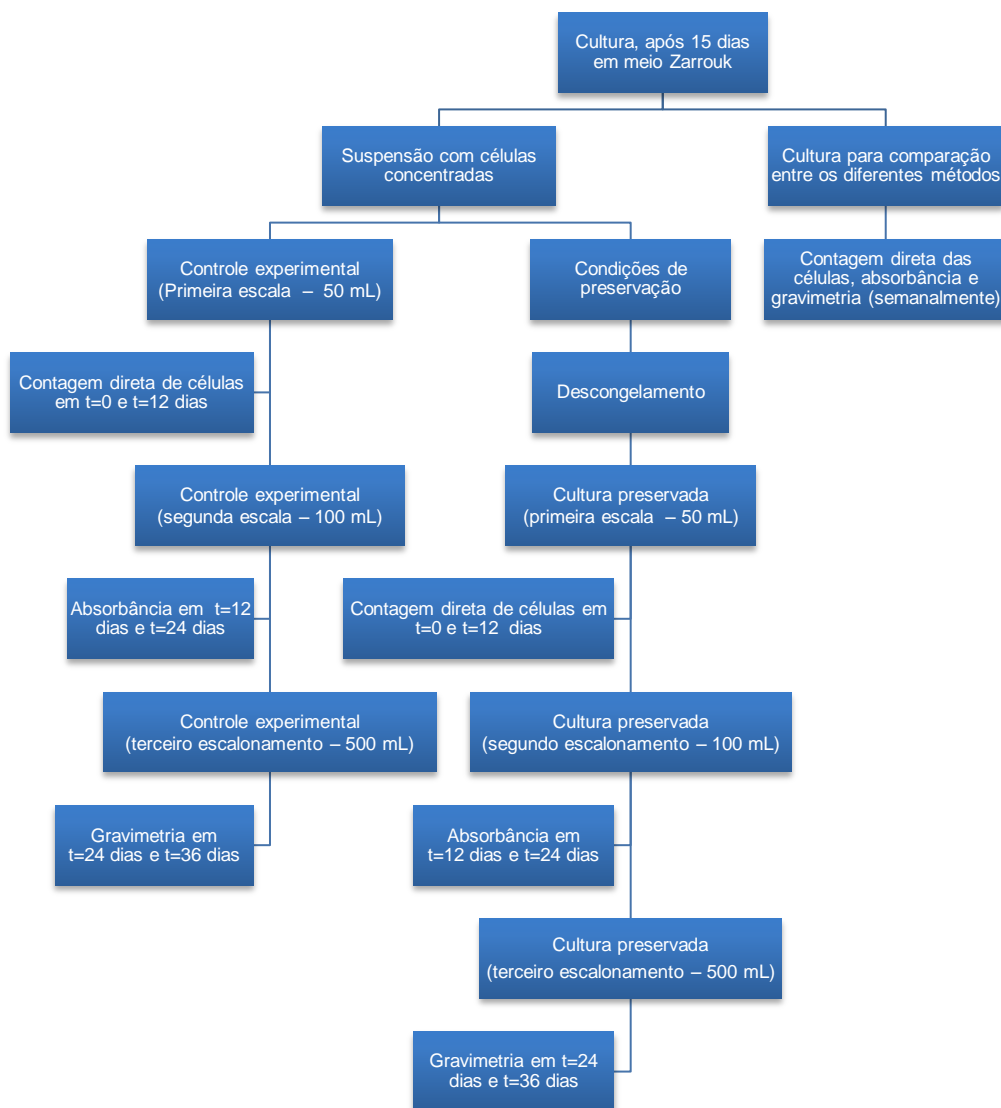


Figura 13 – Fluxograma da técnica de preservação utilizada.

3.4.4 Ensaios de conservação da ficocianina em alimentos

A aplicabilidade da ficocianina, assim como sua conservação foi testada por meio da adição de uma solução aquosa concentrada de ficocianina em amostras de dois produtos alimentícios:

a) leite fermentado sabor natural (pH 3,3), contendo probióticos do gênero *Bifidobacterium*: quatro amostras de 10,0 g, que receberam, respectivamente, doses de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 g da solução de ficocianina;

b) leite fermentado sabor natural, parcialmente desnatado (pH 2,9), contendo probióticos do gênero *Lactobacillus*: cinco amostras de 10,0 g, que receberam, respectivamente, doses de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 g da solução de ficocianina.

Periodicamente, amostras de 0,5 g de cada tubo eram retiradas e em seguida diluídas em 10 mL de água deionizada para então ser feita a medida da absorbância a 620 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo do processo biotecnológico para produção de biomassa e extração da ficocianina da *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo foi realizado através das diferentes cinéticas de crescimento e que tem seus resultados expressos a seguir, traçando-se ainda, comparativos com cultivos de *Chlorella vulgaris*. Os resultados das técnicas aplicadas para a preservação da *Spirulina*, assim como para a purificação da ficocianina obtida, também são elucidados nos próximos itens.

4.1 Cinéticas de crescimento nos diferentes meios e condições de cultivo e sua relação com a obtenção da ficocianina

A cinética 01 foi realizada ao longo de cinquenta e sete dias, com a finalidade de acompanhar os diferentes estágios de crescimento e manutenção da cultura de duas cepas de *Spirulina* sob condições ambientais controladas e meio de cultivo padronizado. A cepa paracas (PAR) chegou ao 57º dia com biomassa de $0,505 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto a cepa LEB-52 atingiu uma concentração de $0,511 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, considerando-se a concentração inicial, que era $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Se compararmos com valores encontrados na literatura, a concentração é relativamente baixa para ambos os cultivos autotróficos, porém, a baixa densidade luminosa ($0,7 \text{ klux}$) pode explicar o lento desenvolvimento das culturas, representado pela Figura 14.

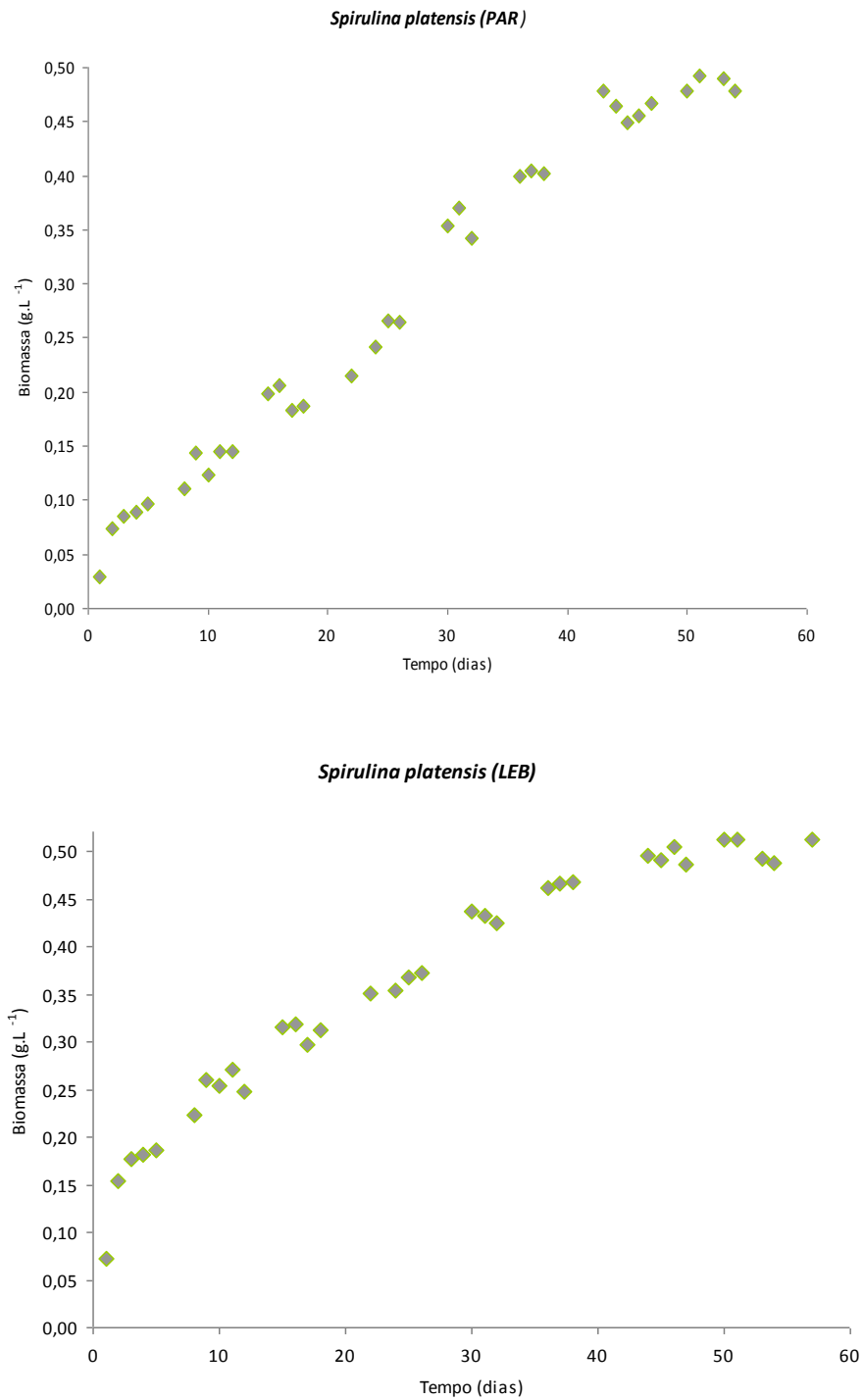


Figura 14 – Cinética de crescimento de duas cepas de *Spirulina* sob as mesmas condições de cultivo.

As velocidades específicas de crescimento μ (d^{-1}) foram determinadas através de regressão polinomial dos valores de biomassa ($g \cdot L^{-1}$) em função do tempo (d) e com o auxílio de software Microsoft Excel 2007. Esse modelo está representado pelas equações a seguir, onde t corresponde ao tempo (em dias) de cultivo:

Biomassa de *Spirulina platensis* (PAR): $X = -7E-08t^4 + 5E-06t^3 - 5E-05t^2 + 0,0084t + 0,0497$

Biomassa de *Spirulina platensis* (LEB-52): $X = -1E-07t^4 + 2E-05t^3 - 0,0007t^2 + 0,0208t + 0,0977$

Esses modelos polinomiais não podem ser diretamente aplicados a cultivos com inóculos de concentrações diferentes, mas são adequados para avaliar a velocidade específica de crescimento. Estas variaram de $0,1432$ a $-0,0007 \cdot d^{-1}$ e $0,1651$ a $0,0373 \cdot d^{-1}$ para as cepas PAR e LEB-52, respectivamente e estão demonstradas da Figura 15. Se comparados com dados da literatura para crescimento em condições autotróficas e que apresentam valores iniciais de $0,33 \cdot d^{-1}$, ambos cultivos apresentaram baixa velocidade específica de crescimento inicial (SILVA, 2008; COLLA *et al*, 2007-a; MULITERNO *et al*, 2005).

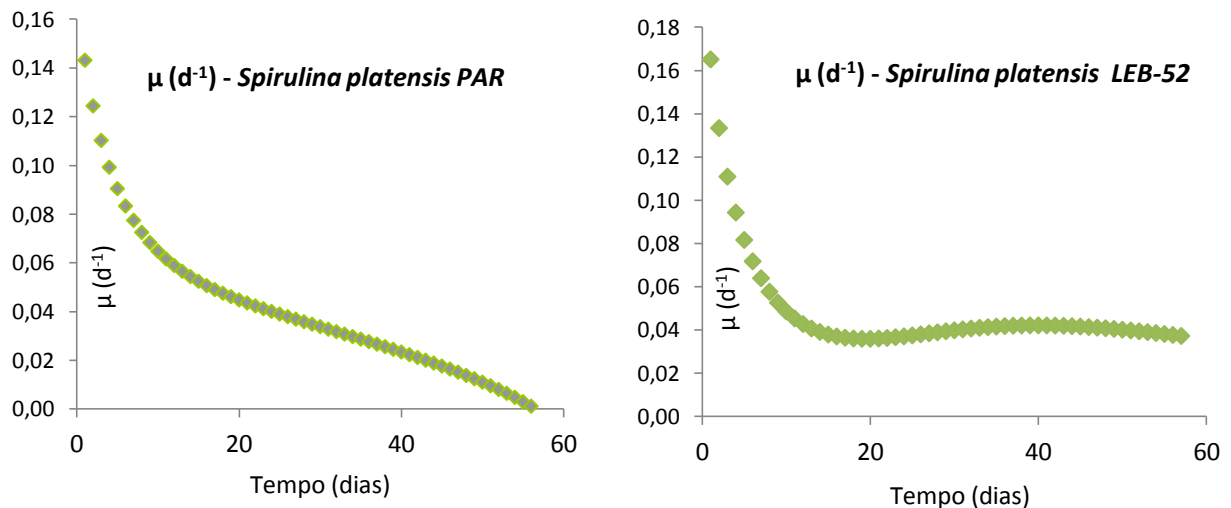


Figura 15 – Gráficos com a velocidade específica de crescimento μ (d^{-1})

A concentração em escala logarítmica da biomassa ($\ln X$) em função do tempo (dias) para as duas cepas está representada na Figura 16, de onde é possível verificar as fases de crescimento exponencial (região linear dos dados), com velocidade específica baixa (pequena inclinação da reta).

A diminuição da fotossíntese e consequentemente, do desenvolvimento algal, é demonstrada através do decréscimo na velocidade específica de crescimento ao longo do período estudado. Após o desenvolvimento inicial, sob certa profundidade a penetração da luminosidade (densidade luminosa) torna-se insuficiente, provocando sombreamento nas regiões centrais do fotobioreator utilizado. Esse fenômeno corresponde ao decréscimo exponencial da densidade luminosa com a profundidade, conforme descrito na lei de Beer-Lambert (FLETCHER, 1979; NOAA-OE, 2011).

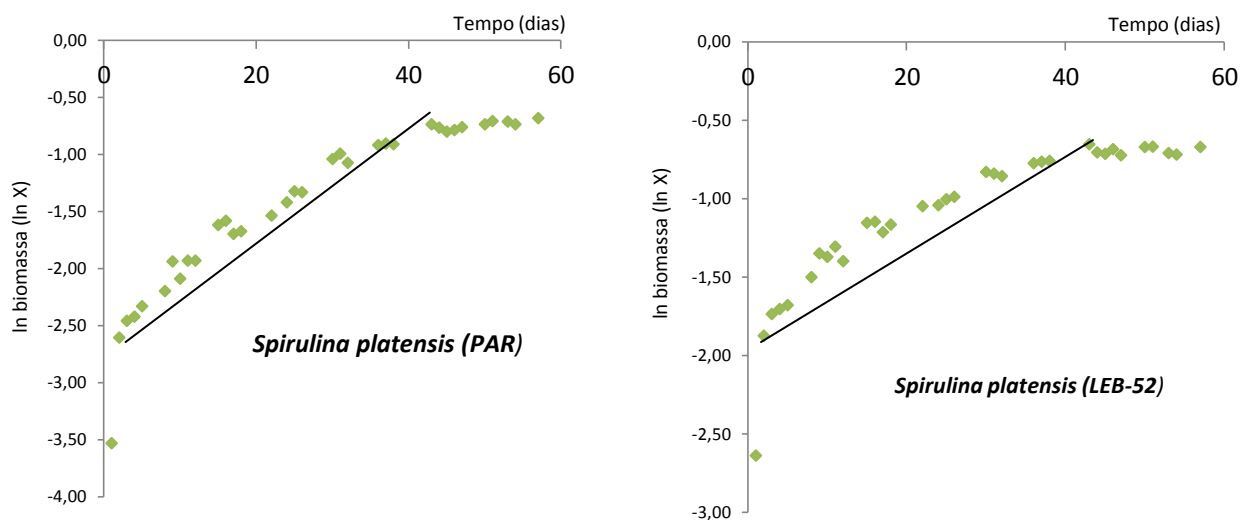


Figura 16 – Logaritmo da concentração de biomassa (X) em função do tempo (dias).

A produtividade obtida no cultivo com *Spirulina platensis* PAR foi de $0,0123 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ e da *Spirulina platensis* LEB-52 foi de $0,0174 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, valores baixos, quando comparados com o cultivo autotrófico em tanque aberto realizado por Pushparaj *et al*, (1997), que obteve produtividade de $0,32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$; por Converti (2006) em fotobioreator tubular e iluminação artificial, que apresentou uma produtividade de $0,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ ou por Lee (2001), que compilou e apresentou resultados de produtividade para cultivo da *Spirulina platensis* em fotobioreator tubular horizontal de $1,60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ e de até $4,30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ em fotobioreator de placas planas. Entretanto, nesses estudos não há menção quanto à concentração inicial do inóculo utilizado e que pode ser maior do que a empregada nesta cinética; por outro lado, a irradiação média em cultivos abertos tende a ser maior que a usada em laboratório.

Se tomarmos como exemplo o polinômio de quarto grau expresso anteriormente, o qual representa a concentração de biomassa ao longo do período de cultivo e o derivarmos até um polinômio de segundo grau, plotando os dados do cultivo em um novo gráfico, é possível determinar o seu ponto de inflexão, correspondente ao final da fase de crescimento exponencial. A Figura 17 ilustra essa técnica, a qual foi empregada em todos os cultivos realizados e que também permitiu concluir que no caso da *Spirulina platensis*, o ponto de inflexão num fotobioreator estacionário ocorre geralmente entre o 15º e o 18º dia de cultivo. A partir desse ponto, ainda há crescimento da microalga, porém, a biomassa existente começa a oferecer uma barreira cada vez maior à entrada de luminosidade, ocasionando um fator limitante ao crescimento exponencial.

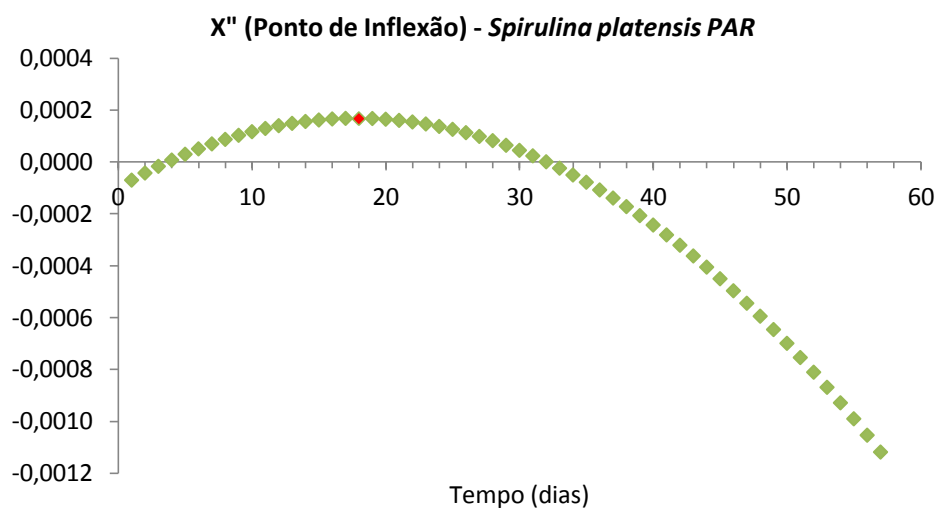


Figura 17 – Ponto de inflexão (X''), obtido no 18º dia de cultivo.

O rompimento celular para a extração das ficobiliproteínas dos cultivos foi realizado sob diferentes condições: ciclos de congelamento e descongelamento com água destilada ou ciclos de congelamento (24 horas) e descongelamento com tampão fosfato 0,1 M e pH 7,5, conforme descrito no item 3.4.1. Os resultados estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 – Rendimento da extração (em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 01.

Cepa	Solvente	FC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	AFC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	FE ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Grau de pureza da FC
PAR	Água destilada	0,032	0,007	0,006	0,58
PAR	Tampão fosfato	0,064	0,008	-	1,06
LEB-52	Tampão fosfato	0,063	0,008	0,001	1,04

Os resultados apresentam-se dentro dos valores levantados por outros autores (ERIKSEN, 2008-b; SILVA, 2008; SARADA *et al*, 2009), embora essa extração tenha sido realizada somente após cinquenta e sete dias de cultivo.

Com relação às outras ficobilinas, não foram detectadas quantidades significativas de ficoeritrina e a aloficocianina foi obtida em quantidade ligeiramente superior, sendo que atualmente a *Spirulina* é utilizada para a obtenção da aloficocianina comercial. Os resultados obtidos também apontam para uma melhor eficiência tanto em termos quantitativos, quanto qualitativos na extração com a utilização de tampão fosfato nos ciclos de congelamento e descongelamento. O grau de pureza da ficocianina foi determinado através da razão A_{620}/A_{280} .

Também foi determinado o espectro de absorção das duas cepas de *Spirulina* e ele está representado na Figura 18.

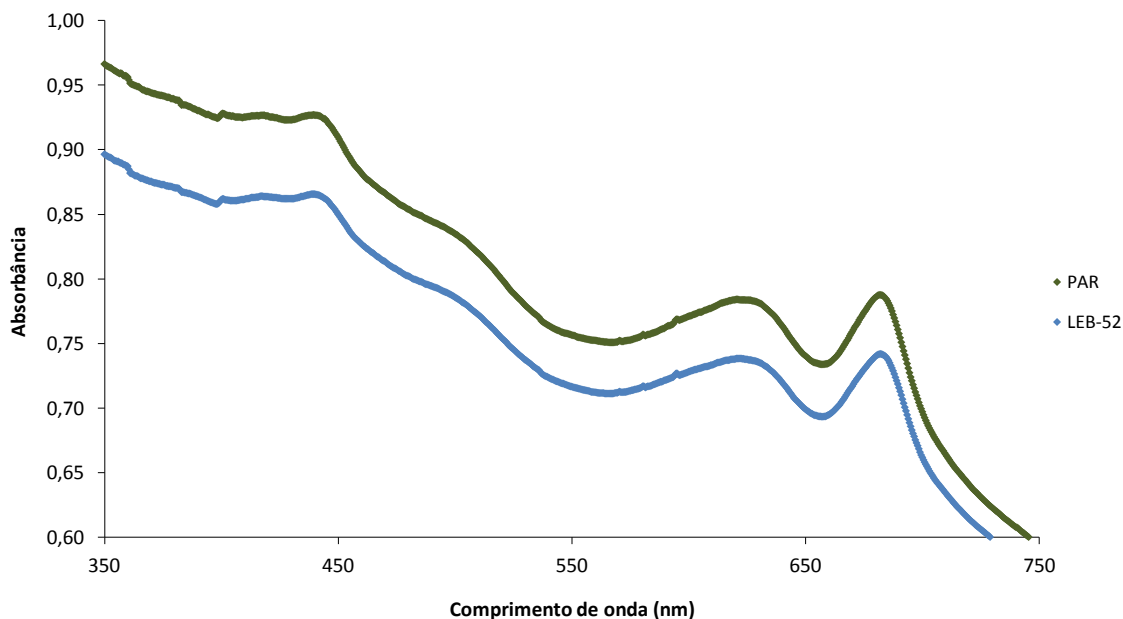


Figura 18 – Espectro de absorção da *Spirulina platensis* (cepas LEB-52 e PAR), em meio Zarrouk.

A segunda cinética foi realizada nas mesmas condições da cinética 01, porém, desta vez com incremento de 0,1 kLux na densidade luminosa, sendo realizada em triplicata e com coletas periódicas de biomassa para extração da ficocianina, de forma a acompanhar a

evolução da **produção do pigmento** ao longo das fases de crescimento da *Spirulina platensis* PAR. A produtividade obtida nos cultivos foi de $0,0203 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ e a biomassa aos vinte e três dias de cultivo foi de $0,4824 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Esses resultados, se comparados com os obtidos na cinética 01, permitem concluir que o pequeno aumento na densidade luminosa pode ter provocado o aumento na produtividade assim como a obtenção de uma concentração final semelhante, num período bem mais curto (23 dias). Por outro lado, as alíquotas contendo 5,0 mL da cultura que eram retiradas na mesma frequência para a extração da ficocianina produzida mostraram-se insuficientes para sua quantificação através do método de determinação utilizado e descrito anteriormente, uma vez que os valores obtidos oscilaram em demasia e sem relação direta com o desenvolvimento da biomassa, conforme demonstram as Figuras 19 e 20.

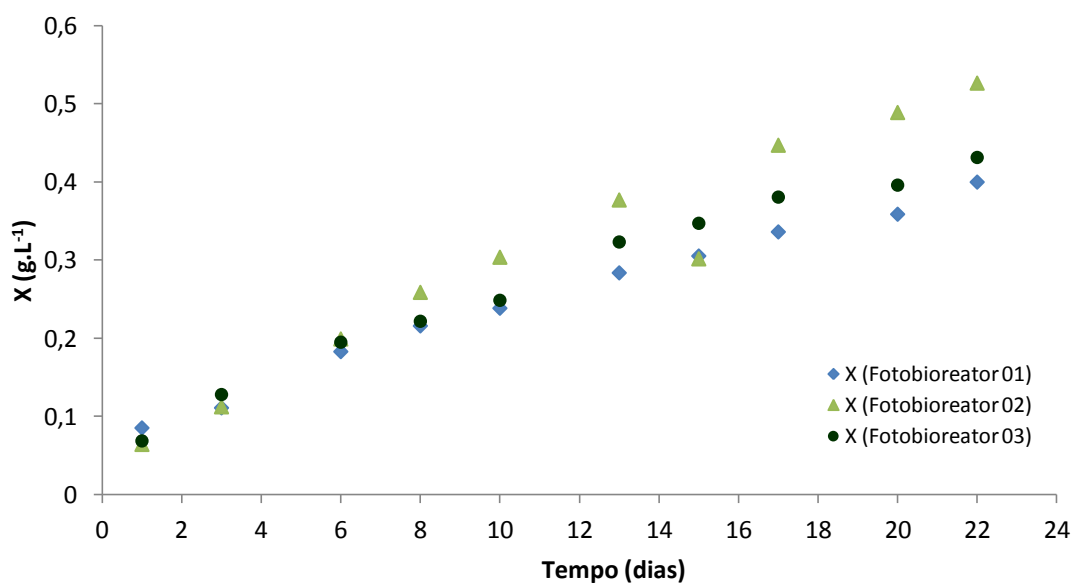


Figura 19 – Biomassa (X , em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) produzida no período de cultivo.

Após a realização dos cultivos relatados nas cinéticas 01 e 02, onde o ambiente possuía as suas condições controladas, outros estudos envolveram a realização da terceira cinética, desta vez envolvendo condições mais próximas de um cultivo comercial.

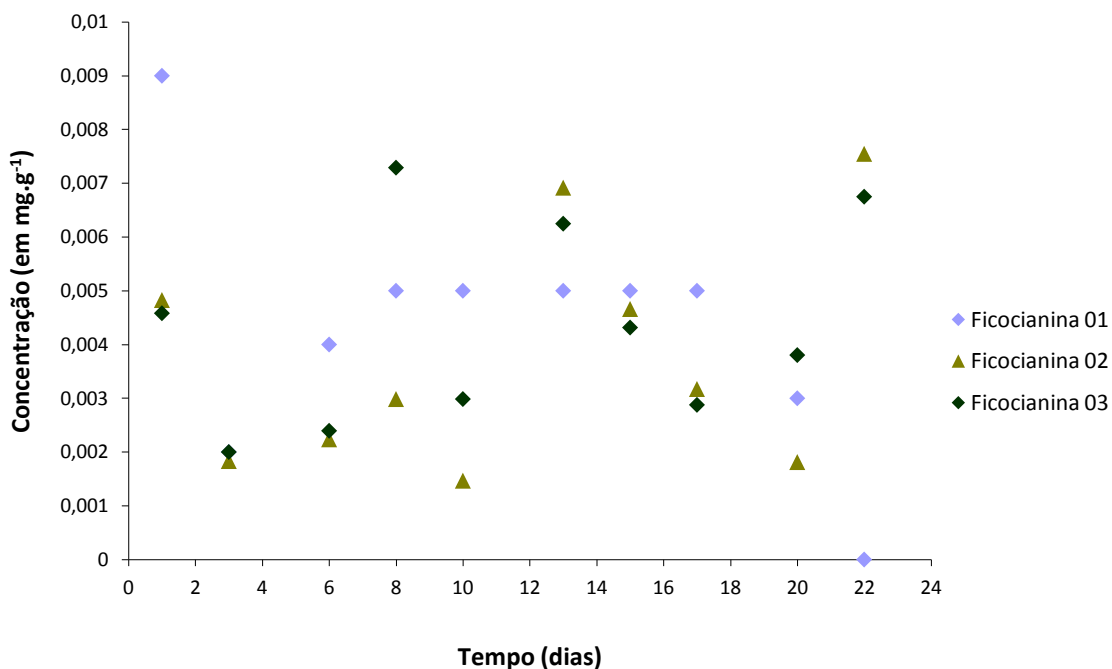


Figura 20 - Quantidade de ficocianina obtida (em mg.g⁻¹ de biomassa seca), no mesmo período de cultivo da Figura 19.

Apesar de algumas questões como a concentração de ficocianina em função do tempo ainda não terem sido totalmente elucidadas, as cinéticas 01 e 02 permitiram avaliar os tempos típicos de cultivo e a eficiência dos rompimentos, de forma que a realização de ensaios em escala um pouco maior poderiam permitir o crescimento sob luz natural e com a aplicação de filtros luminosos. A cinética 03, portanto, submeteu culturas de *Spirulina platensis* PAR às seguintes condições de cultivo: utilização de tanques com maior capacidade, meios de cultura, reatores e sistema de aeração não esterilizados, sujeitando as culturas aos ciclos de iluminação natural e a maiores variações de temperatura. Outra situação a ser considerada nesse caso foi a utilização de filmes (filtros luminosos) nas três cores primárias, cada um sendo aplicado sobre um tanque, com a finalidade de estudar o fenômeno da adaptação cromática complementar citado por alguns autores e se realmente haveria alguma consequência para a produção do pigmento de interesse quando comparado com um dos tanques que não foram cobertos com nenhum filme colorido. A concentração de biomassa (X) em função do tempo (dias) está representada na Figura 21, para os quatro fotobioreatores.

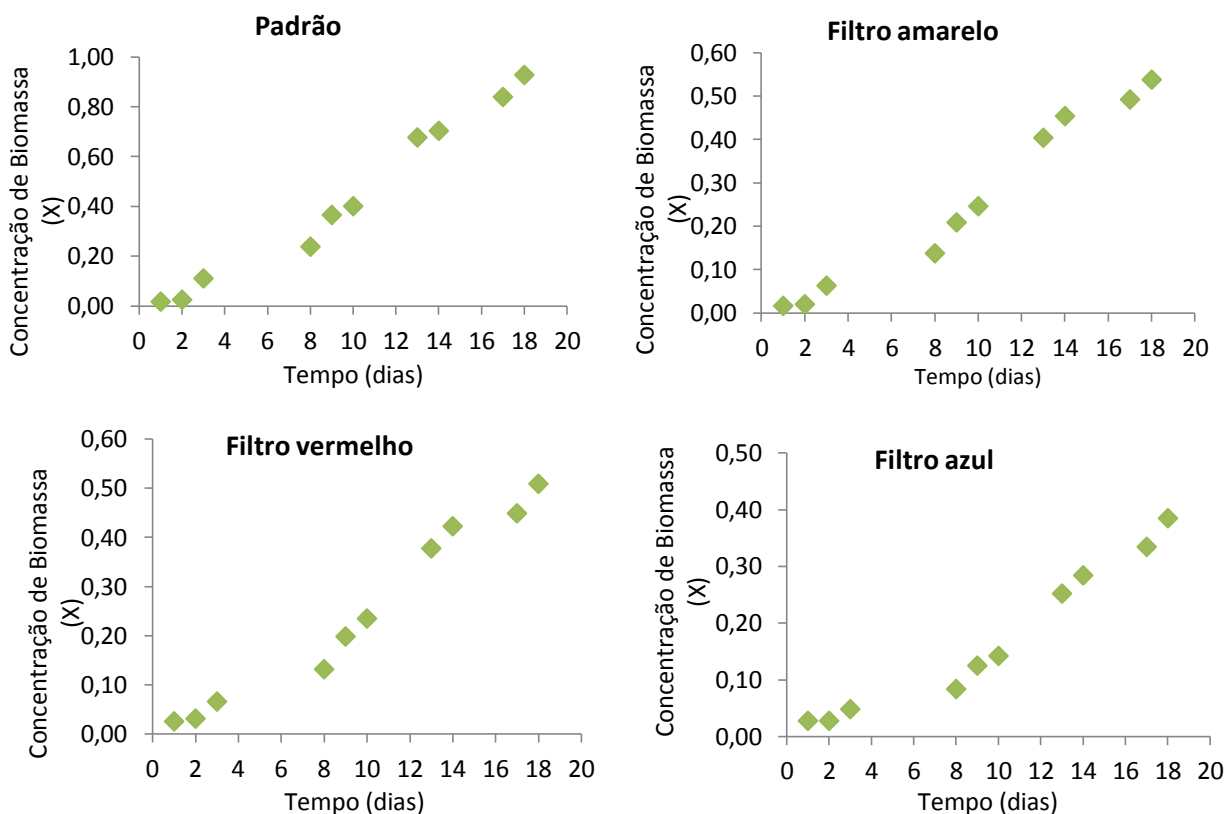


Figura 21 – Concentração de biomassa (X) em função do tempo (dias).

Ao término dos dezoito dias de cultivo, as culturas com o filtro amarelo, com o filtro vermelho, com o filtro azul e padrão, apresentaram os resultados de concentração e produtividade em termos de biomassa, demonstrados na Tabela 12. Já a Figura 22 apresenta o comparativo da evolução da produção de biomassa no período de cultivo.

Tabela 12– Biomassa (X) e produtividade (P) obtida nos fotobioreatores da cinética 03.

Fotobioreator/filtro	X_{inicial} (g·L ⁻¹)	X_{final} (g·L ⁻¹)	P (g·L ⁻¹ ·dia ⁻¹)	Densidade luminosa (klux)
Padrão	0,017	0,93	0,042	1,7
Amarelo	0,017	0,54	0,024	1,3 ¹
Vermelho	0,026	0,51	0,022	0,8 ¹
Azul	0,027	0,38	0,013	1,0 ¹

Nota: (1) sob o filtro.

É interessante ressaltar que apesar do inóculo ser o mesmo, na mesma concentração e possuir a medida da absorbância semelhante (0,022 – Reator Padrão; 0,024 – Filtro Amarelo; 0,026 – Filtro vermelho e 0,027 – Filtro azul) os valores da concentração inicial X_{inicial}

diferenciam-se, conforme demonstrado na Tabela, pois são resultado da aplicação da equação resultante da curva de calibração.

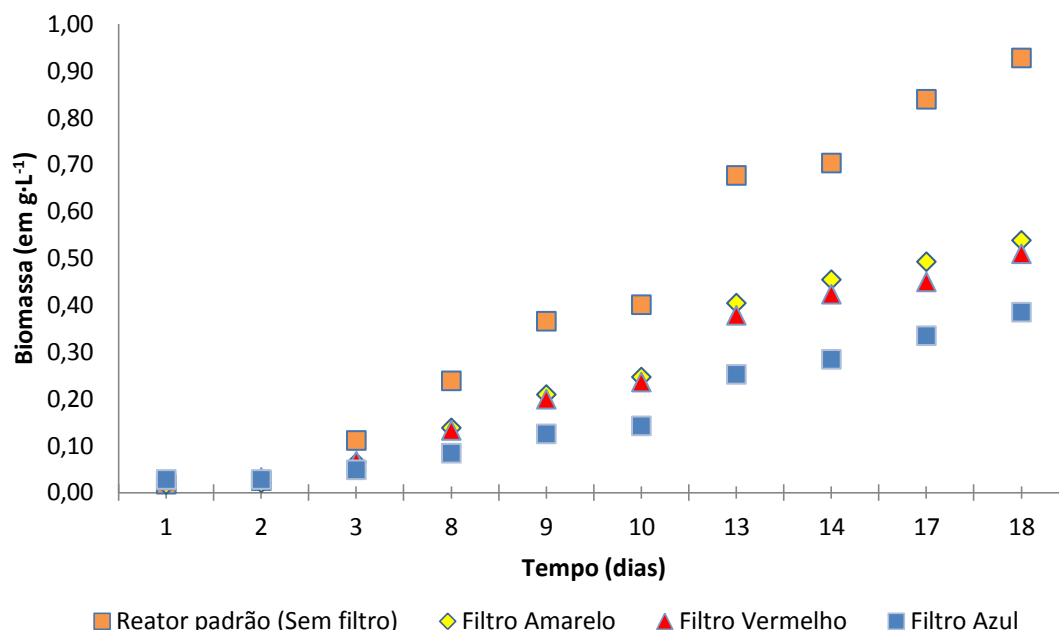


Figura 22 – Concentração de biomassa (g.L⁻¹) em função do tempo (dias).

O comparativo entre a quantidade de ficocianina obtida e seu grau de pureza está na Tabela 13, a seguir, que também relaciona a quantidade de aloficocianina obtida e a densidade luminosa medida sob o efeito dos filtros utilizados:

Tabela 13 – Rendimento da extração (em mg.g⁻¹ de biomassa seca) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 03.

Fotobioreator/filtro	FC (mg.g ⁻¹)	AFC (mg.g ⁻¹)	Grau de pureza da FC	Densidade luminosa (klux)
Padrão	0,237	0,089	0,804	1,7
Amarelo	0,174	0,049	0,687	1,3 ¹
Vermelho	0,198	0,055	1,100	0,8 ¹
Azul	0,144	0,061	0,718	1,0 ¹

Nota: (1) sob o filtro.

A aeração aplicada nessa cinética foi o dobro daquela aplicada nas cinéticas 01 e 02, porém e como pode ser visto na Tabela 12, a luz natural aplicada possuía maior densidade luminosa, representando uma melhor condição para incremento da produtividade da biomassa. Por outro lado, a produção de ficocianina não foi diretamente proporcional à densidade

luminosa, apresentando resultados interessantes quando aplicado o filtro vermelho e comprovando resultados da literatura que se referem à capacidade de adaptação cromática de algumas microalgas, que alteram as proporções de pigmentos produzidos para favorecer a absorção de luz no comprimento de onda deficitário daquele ambiente.

Se considerarmos que determinados fatores ambientais envolvidos na terceira cinética poderiam ocasionar resultados pouco confiáveis, foi conduzido um novo estudo, dessa vez com as condições ambientais controladas e caracterizado como a quarta cinética desse trabalho. Sendo assim, na cinética 04 buscou-se estudar o desenvolvimento da biomassa de *Spirulina platensis* LEB-52 sob condições controladas e sob a aplicação dos mesmos filtros luminosos, acrescentando-se mais um fotobioreator no qual foi utilizado um filme na cor verde, totalizando cinco fotobioreatores. A escala de cultivo foi reduzida para tubos de cultura celular com capacidade de 0,20 L, empregando iluminação artificial e sem aeração forçada. Os resultados obtidos para a biomassa e a produtividade sob os diferentes filmes coloridos estão na Tabela 14, a seguir. O comparativo da evolução na produção de biomassa de cada fotobioreator, no período de cultivo encontra-se na Figura 23, também a seguir.

Tabela 14 – Biomassa (X) e produtividade (P) obtida nos fotobioreatores da Cinética 04.

Fotobioreator/filtro	X _{inicial} (g·L ⁻¹)	X _{final} (g·L ⁻¹)	P (g·L ⁻¹ ·dia ⁻¹)	Densidade luminosa (klux)
Padrão	0,035	0,599	0,022	1,2
Amarelo	0,020	0,491	0,020	0,9 ¹
Vermelho	0,045	0,415	0,015	0,6 ¹
Verde	0,059	0,398	0,011	0,7 ¹
Azul	0,026	0,300	0,010	0,7 ¹

Nota: (¹) sob o filtro.

Esses resultados comprovam que a produção de biomassa não foi proporcional à densidade luminosa e que ela também pode ser influenciada pelas faixas de espectro luminoso disponíveis. É o caso do fotobioreator sob o filtro azul, que apresentou produtividade inferior aos fotobioreatores com filtros verde e vermelho, que por sua vez estavam sob densidade luminosa igual ou menor, respectivamente.

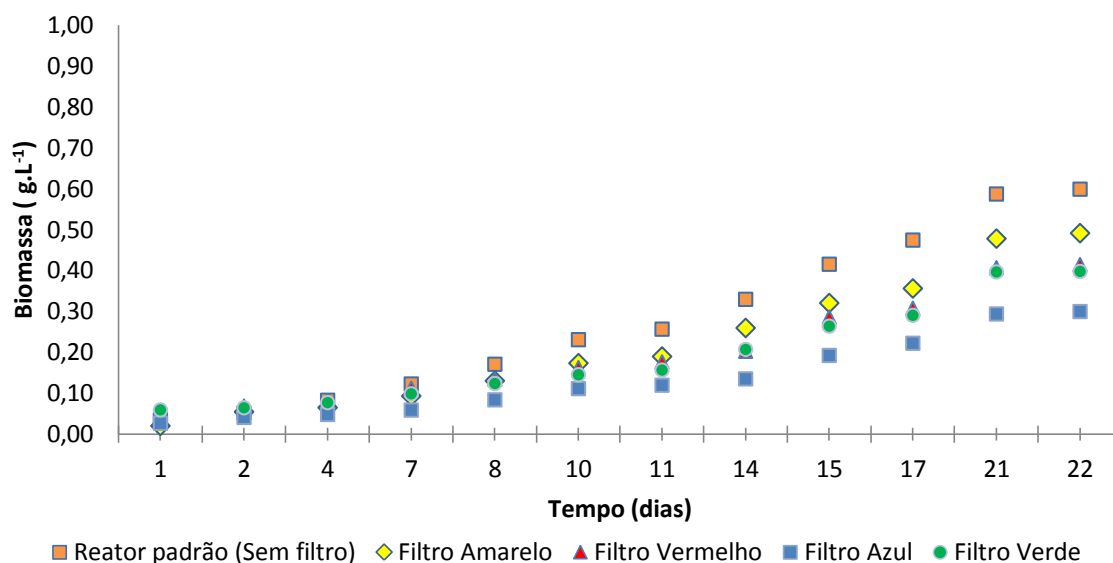


Figura 23 – Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nos cinco fotobioreatores em função do tempo (dias).

Um novo estudo, caracterizado pela quinta cinética, empregou condições de cultivo semelhantes à cinética 04, mas com algumas modificações com o objetivo de identificar um comportamento, ou uma resposta da espécie (*Spirulina platensis*) em estudo sob as condições de cultivo, principalmente quando submetida aos diferentes padrões de iluminação. Dessa forma, foi utilizada a *Spirulina platensis* PAR, os tubos de cultura celular foram mantidos em câmara de cultivo sob agitação (*shaker*) com iluminação do ambiente. Os resultados obtidos para a biomassa e a produtividade sob os diferentes filmes coloridos estão na Tabela 15, a seguir. O comparativo da evolução na produção de biomassa de cada fotobioreator, no período de cultivo encontra-se na Figura 24.

Tabela 15 – Biomassa (X) e produtividade (P) obtida nos fotobioreatores da Cinética 05.

Fotobioreator/filtro	X_{inicial} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_{final} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	P ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Densidade luminosa (klux)
Padrão	0,116	0,624	0,020	1,0
Amarelo	0,130	0,584	0,014	0,8 ¹
Vermelho	0,128	0,397	0,007	0,5 ¹
Verde	0,122	0,381	0,007	0,6 ¹
Azul	0,126	0,252	0,002	0,6 ¹

Nota: (¹) sob o filtro.

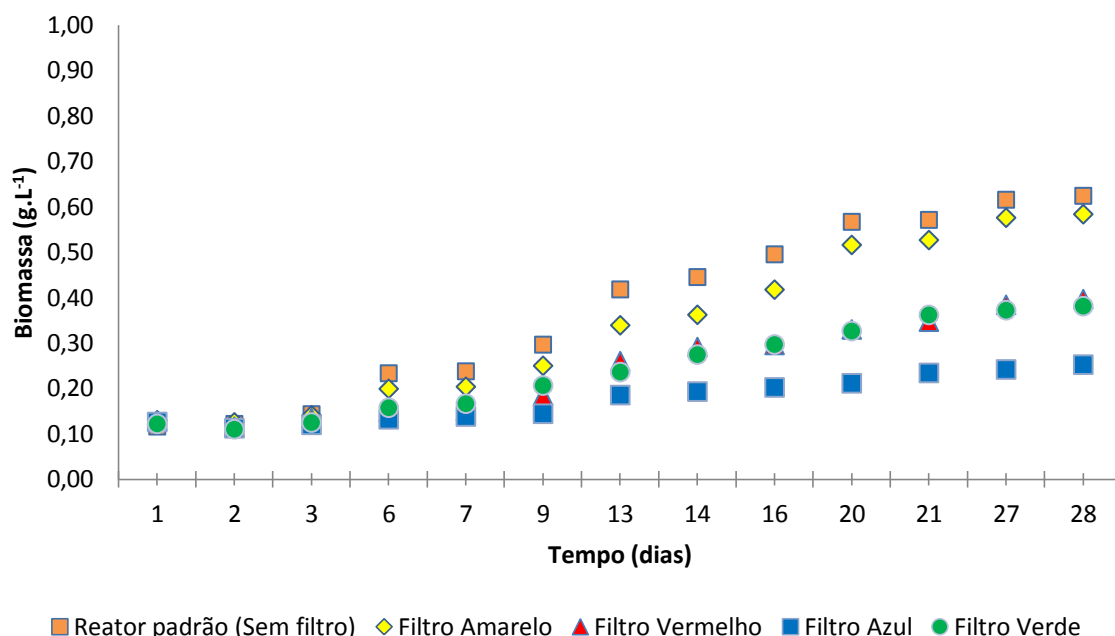


Figura 24 – Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nos cinco fotobioreatores em função do tempo (dias).

Com relação à produção de ficocianina, os resultados obtidos para os diferentes fotobioreatores e que estão na Tabela 16, demonstram que o fenômeno da adaptação cromática complementar deve ter ocorrido, uma vez que o cultivo realizado sob o filme vermelho apresentou uma quantidade de ficocianina elevada e desproporcional à densidade luminosa recebida. Cabe ressaltar que essa cinética foi mantida por dez dias a mais que a cinética 03.

Tabela 16 – Rendimento da extração (em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 05.

Fotobioreator/filtro	FC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Grau de pureza da FC	Densidade luminosa (klux)
Padrão	0,139	0,551	1,0
Amarelo	0,122	0,519	0,8 ¹
Vermelho	0,138	0,662	0,5 ¹
Verde	0,102	0,539	0,6 ¹
Azul	0,081	0,556	0,6 ¹

Nota: (¹) sob o filtro.

Para facilitar a comparação, a Tabela 17 relaciona os dados obtidos até o 18º dia de cultivo nas cinéticas 03, 04 e 05:

Tabela 17 - Comparação da produtividade (biomassa) obtida até o 18º dia de cultivo sob os diferentes filtros.

Cinética	Produtividade – por fotobioreator, em g·L ⁻¹ ·dia ⁻¹				
	Padrão	Amarelo	Vermelho	Verde	Azul
03	0,053	0,030	0,028	-	0,021
04	0,027	0,021	0,016	0,014	0,012
05	0,025	0,019	0,011	0,012	0,005

A Figura 25, a seguir, mostra o espectro luminoso dos diferentes filtros utilizados, comparados com o espectro de absorção de uma cultura em meio líquido (Zarrouk) de *Spirulina platensis*. É possível então verificar que sua absorção é elevada por todo o espectro da luz visível, o que demonstra a complementaridade das clorofilas (que absorvem principalmente luz azul e vermelha) e das ficobilinas, especialmente o pigmento azul – ficocianina – que absorve principalmente as luzes amarelo, laranja e vermelho, resultando numa alta capacidade de absorver energia por todo espectro luminoso. Esse pigmento característico da *Spirulina* possibilita a absorção de maiores porções da luz incidente principalmente nos comprimentos de onda próximos a 620 nm e 670 nm, como geralmente acontece nas cianobactérias (CHRONAKIS *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2000 e 2002; COLLA *et al.*, 2007-b).

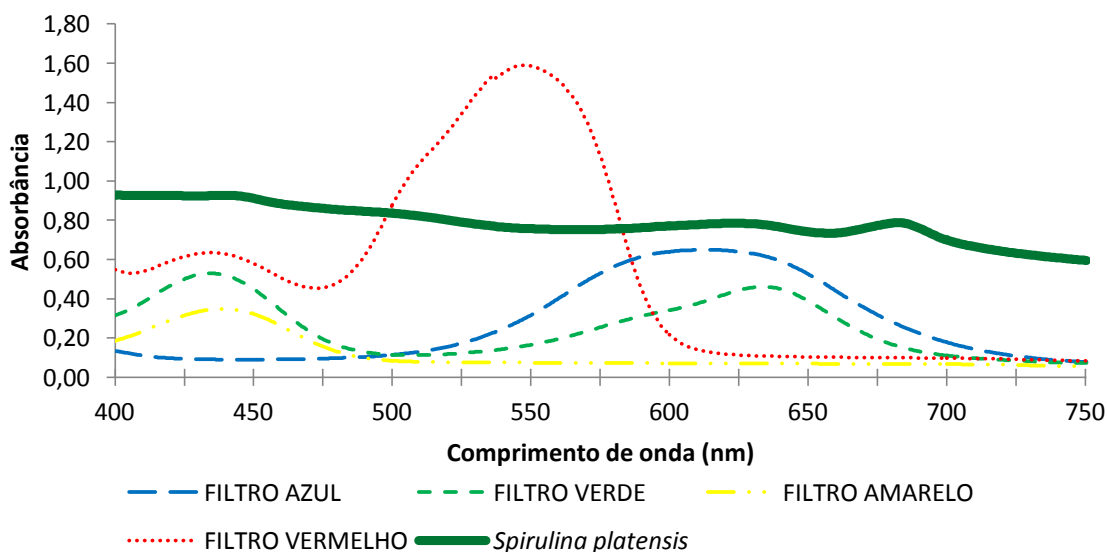


Figura 25 – Espectro de absorção dos diferentes filtros utilizados, comparados com o espectro da *Spirulina platensis*.

É possível fazermos uma analogia com o trabalho de Monteiro *et al*, (2010), que demonstraram como um sistema com aeração artificial contínua pode reduzir o tempo de cultivo e poderia ser mais efetivo para melhoria nos resultados econômicos do processo. Além disso, a concentração da biomassa também apresenta uma resposta à densidade luminosa e às faixas do espectro disponíveis para a microalga: quando os filtros foram utilizados, a concentração de biomassa foi menor que a concentração dos reatores padrão, em todos os casos. Por outro lado, apesar do fotobioreator azul apresentar uma densidade luminosa semelhante ou até menor que a intensidade do verde e vermelho, a quantidade obtida de biomassa foi sempre inferior no fotobioreator azul, caracterizando um padrão de crescimento e resposta aos filtros luminosos semelhante nas três cinéticas estudadas.

Se analisada a produção de ficocianina, que é elevada quando utilizado o filtro vermelho, poderiam ser alcançados resultados mais representativos a respeito da resposta de crescimento da *Spirulina* num intervalo de espectro mais estreito e representativo da luz vermelha se fossem utilizadas lâmpadas de LED (light-emitting diode, ou diodo emissor de luz). Os estudos experimentais de Wang *et al*, (2007) sobre a influência dos comprimentos de onda luminosos e a intensidade de vários LEDs sobre a *Spirulina platensis* também demonstraram altas taxas de crescimento sob a luz vermelha, enquanto a luz azul demonstrou a menor eficiência na conversão dos fótons. A simulação desse fenômeno da adaptação cromática ocorrido nos cultivos de *Spirulina platensis* e suas conseqüências na produção de ficocianina está representado na Figura 26.

Tanto na cinética 03 quanto na cinética 05, onde a produção de ficocianina foi analisada, um dado importante está relacionado com o grau de pureza da ficocianina obtida. Na cinética 03, onde o gasto energético resume-se apenas à aeração forçada, a aplicação do filtro vermelho incrementou em quase 30% o grau de pureza da ficocianina obtida, se comparado com o cultivo tradicional. Esses estudos nos permitem indicar preliminarmente que, para obtenção de ficocianina com maior grau de pureza inicial, em quantidade considerável e sob um menor custo energético com a densidade luminosa, **deveríamos cultivar a *Spirulina platensis* sob luz vermelha, especialmente lâmpadas do tipo LED**, quando o cultivo em ambiente fechado for necessário.

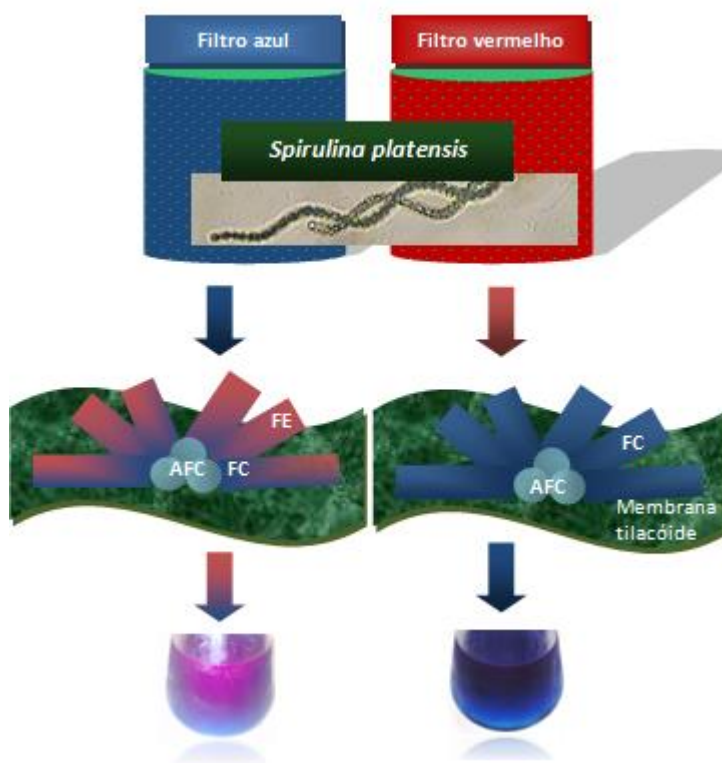


Figura 26 – Simulação do fenômeno do processo de aclimação cromática complementar constatado nos cultivos de *Spirulina platensis*.

Considerando os aspectos relacionados com a melhoria das condições ambientais e a complementação de sistemas de tratamento de efluentes (líquidos ou gasosos), a utilização de **águas residuárias** (efluentes líquidos) como meio de cultivo alternativo para a microalga *Spirulina platensis* também foi estudada e tem seus resultados apresentados a partir da cinética 06.

Na sexta cinética, foi necessário diluir o efluente para reduzir o efeito tóxico da amônia, adicionando-se também bicarbonato de sódio ($3,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) em cada um dos fotobioreatores com dois propósitos: diminuição do caráter ácido do meio de cultivo e a disponibilização de uma fonte de carbono sabidamente assimilável, já que o efluente primário das pocilgas possui alta carga de nutrientes não decompostos, assim como altos níveis de contaminação microbiológica, fatores que podem dificultar o bom desenvolvimento da *Spirulina*.

O uso de efluente primário das pocilgas justifica-se pelo fato de ser um substrato obtido com o mínimo de manejo, ou seja, sua obtenção se dá com custo operacional irrisório e sem tempo de residência dentro da instalação rural.

A Figura 27 apresenta um comparativo entre o desenvolvimento da biomassa em função do tempo (dias) para as diferentes diluições do efluente e um fotobioreator com o meio de cultura padrão (Zarrouk) que também recebeu a mesma dose de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). A maior concentração de biomassa ($0,494 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) obtida foi no oitavo dia do cultivo realizado com efluente diluído a 20 % v/v. De maneira análoga, Anaga e Abu (1996) cultivaram *Spirulina* em efluente com altas concentrações de PO_4^{3-} e NO_3^{-1} , obtido de uma indústria de fertilizantes da Nigéria e obtiveram uma concentração de $2,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, porém, relataram o colapso que a cultura sofreu, também em um curto período de cultivo.

O fato de nenhum meio de cultivo nessa cinética estar esterilizado justifica-se pela necessidade de não provocar alterações físicas ou químicas no substrato, favorecendo o estudo da sua aplicabilidade em culturas de *Spirulina* e a resposta de crescimento dessa cianobactéria; além disso, o desenvolvimento de um processo que não exija esterilização (e portanto energia extra) é economicamente interessante. Entretanto, a biomassa dos microrganismos presentes, aliada à característica físico-química do meio, acabaram influenciando nos resultados da Figura 27, principalmente na concentração inicial de biomassa, pois o seu cálculo é realizado com base em uma correlação da biomassa seca, a equação resultante da curva de calibração e os valores encontrados com a leitura da absorbância ao longo do período estudado. Os valores apresentados, não correspondem à realidade, provavelmente incluindo outros materiais suspensos além da biomassa, e outra técnica de contagem e determinação de biomassa deve ser considerada nessas condições de cultivo.

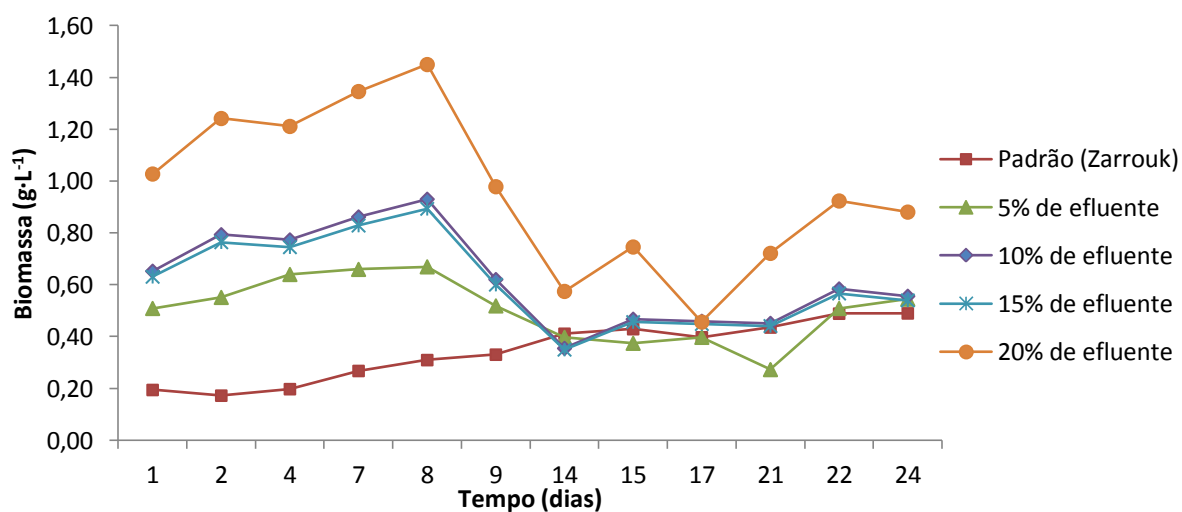


Figura 27 – Comparativo do crescimento de culturas inoculadas em diferentes diluições de efluente primário de suínos.

Por outro lado, ao relacionar na Figura 28 os dados obtidos com a leitura da absorbância a 670 nm, que é o comprimento de onda específico da clorofila-a – e que está presente na alga em estudo - com o tempo (dias) de cultivo, obtemos uma Figura mais representativa de como a *Spirulina* respondeu quando cultivada num meio adicionado de efluente de suínos *in natura* e sem qualquer tratamento prévio.

No final do período de cultivo, constata-se a diminuição na presença de clorofilas – e da cor verde característica da microalga – além de alterações morfológicas nos tricomas: é possível observar na Figura 29 que os tricomas da *Spirulina* cultivada na presença de efluente de suínos ficaram mais alongados e com mais espirais ao longo dos filamentos quando comparados com aqueles cultivados em meio Zarrouk, onde ocorre a fissão binária de suas células vegetativas que caracteriza sua reprodução. A propósito, o formato helicoidal é bastante influenciado pelos fatores ambientais, como já foi relatado na literatura (VONSHAK, 1997; SILVA, 2008; SCHELDEMAN *et al*, 1999; SPILLER *et al*, 2010).

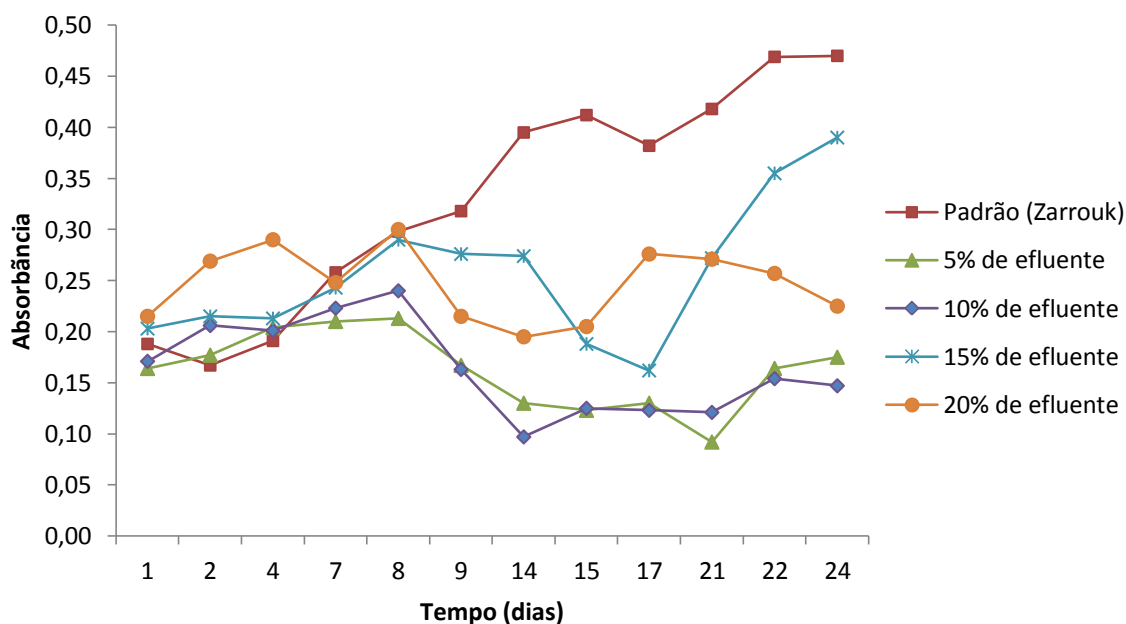


Figura 28 – Comparativo obtido através da medida de absorbância a 670 nm.

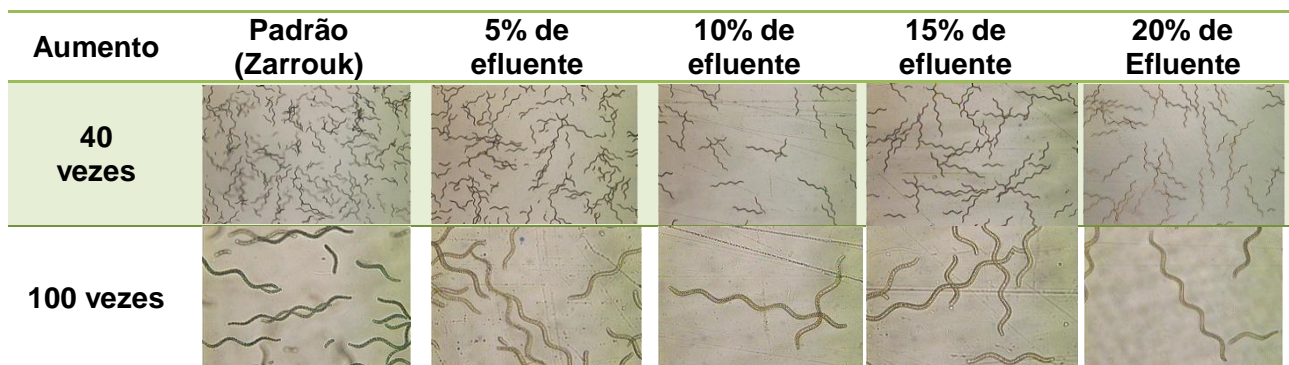


Figura 29 – Alterações morfológicas visíveis nos cultivos realizados em efluente.

Nesses ensaios com efluentes, a extração de ficocianina foi realizada através da adição de tampão fosfato, ciclos de congelamento e descongelamento e precipitação com solução saturada de sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. A quantidade obtida, assim como o grau de pureza obtido sob cada condição de cultivo encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Rendimento da extração (ficocianina em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e grau de pureza da ficocianina obtida – Cinética 06

Fotobioreator	FC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Grau de pureza da FC
Padrão	0,059	0,880
5% de efluente	0,010	0,090
10% de efluente	0,008	0,074
15% de efluente	0,010	0,092
20% de efluente	0,009	0,093

O rendimento da extração realizada na biomassa obtida de todos os fotobioreatores demonstrou que a produção do biopigmento foi prejudicada naqueles onde houve adição do efluente, conforme demonstrado na Tabela anterior. A quantificação do pigmento obtido pode ter sofrido alguma interferência quando as leituras da absorbância a 280 nm foram realizadas, porém, isso não foi considerado uma vez que o aspecto final da cultura não era favorável. Sendo assim, a obtenção de ficocianina através do cultivo da *Spirulina* com efluente *in natura* apresenta resultados muito ruins quando comparados com o fotobioreator padrão, tanto em termos quantitativos, quanto qualitativos.

Em outros testes, dessa vez na cinética 07, a *Spirulina platensis* LEB-52 foi cultivada durante 22 dias em diferentes fotobioreatores com os seguintes meios de cultura: efluente

sintético de suíno a 10% v/v (padrão de comparação), efluente terciário, ou seja, do estágio final do tratamento, *in natura* e diluído a 10% v/v, de indústria processadora de produtos cárneos localizada em Montenegro/RS, efluente terciário diluído a 10% e adicionado de uma fonte de Carbono inorgânico ($1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bicarbonato de Sódio) e efluente terciário diluído a 10% e adicionado de uma fonte de Nitrogênio inorgânico ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Nitrato de Sódio), todas em frascos Erlenmeyer de 2,0 L, na sala do Laboratório de Engenharia de Microalgas (UFPR) com ambiente climatizado à temperatura de $30\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, com intensidade de 0,8 klux) em ciclos 12:12 h e aeração contínua por meio de borbulhamento de ar a $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados obtidos em termos de desenvolvimento da biomassa algal estão respresentados na Tabela 19, a seguir.

Tabela 19 – desenvolvimento da biomassa e produtividade da *Spirulina platensis* LEB-52.

Fotobioreator	$X_{\text{inicial}} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$X_{\text{final}} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$P_{\text{média}} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1})$
Efluente sintético	0,083	0,465	0,016
Efluente industrial a 10%	0,058	0,267	0,010
Efluente industrial a 10% + fonte de carbono	0,105	0,433	0,020
Efluente industrial a 10% + fonte de nitrogênio	0,106	-	-

O fotobioreator onde o meio de cultivo utilizado foi o efluente sintético apresentou desenvolvimento da biomassa algal e produtividade com resultados semelhantes a aqueles obtidos em cultivos anteriores e sob as mesmas condições, com meio padrão (Zarrouk). Esses resultados também foram semelhantes aos obtidos por Bertolin *et al*, (2005) que obtiveram $0,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de *Spirulina platensis* LEB-5252 cultivada em efluente sintético a 50% v/v e $0,35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de *Spirulina platensis* PAR cultivada em efluente sintético a 80% v/v. Já o fotobioreator onde o meio de cultivo foi efluente diluído a 10%, o crescimento não foi satisfatório, porém, naquele onde houve adição de bicarbonato de sódio como fonte alternativa de carbono, os resultados apresentaram uma melhora considerável, possivelmente pela maior disponibilidade de carbono. Por outro lado, a adição de nitrato de sódio combinada com o efluente industrial não foi adequada para a *Spirulina*, visto que a cultura pereceu.

Um aspecto a ser novamente considerado refere-se à alteração morfológica nos tricomas da *Spirulina*, com conseqüente aumento no número de espirais e do comprimento de seus filamentos, conforme demonstrado na Figura 30.



Cultivo com meio padrão, da cinética 06



Cultivo com efluente terciário



Cultivo com efluente terciário e adição de NaHCO_3

Figura 30 – Alterações morfológicas na *Spirulina platensis* LEB-52 submetida a diferentes meios de cultivo e observada em microscópio com aumento de 40 vezes.

Através da análise comparativa das fotografias expostas acima, é possível identificar as principais alterações morfológicas nos cultivos realizados com efluente: coloração dos tricomas próxima da cor castanho, além maior comprimento dos tricomas. A produção de ficocianina nesses meios de cultivo alternativos foi prejudicada e os valores obtidos foram muito reduzidos, se comparados com os dados obtidos anteriormente nas cinéticas realizadas com meio Zarrouk sob as mesmas condições ambientais, conforme observado na Tabela 20.

Tabela 20 – Produção de ficocianina, aloficocianina e grau de pureza obtidos – Cinética 07.

Fotobioreator	FC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Grau de pureza da FC	AFC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
Efluente sintético	0,034	0,320	0,027
Efluente industrial a 10%	0,029	0,262	0,023
Efluente industrial a 10% + fonte de carbono	0,025	0,238	0,022
Efluente industrial a 10% + fonte de nitrogênio	-	-	-

Apesar dos resultados pouco animadores com relação à produção de ficocianina de *Spirulina platensis* cultivada em efluente industrial, a quantidade de resíduos da agroindústria nacional é abundante, mas com pouco ou nenhum aproveitamento. Esse é o caso da *manipueira*, que apresenta em sua composição macro e micronutrientes como o fósforo, o potássio, magnésio e cálcio, além de duas substâncias altamente tóxicas: o cianeto e o ácido cianídrico vem sendo costumeiramente despejada no solo e nos cursos d'água sem nenhum tratamento prévio.

Considerando a disponibilidade desse resíduo no Paraná, foi delineada a cinética 08, onde são feitas algumas considerações: foi realizado um cultivo preliminar com a finalidade de se verificar a viabilidade das culturas. Este teste preliminar envolveu o cultivo de *Spirulina platensis* PAR em frascos Erlenmeyer de 0,25 L em manipueira bruta, manipueira bruta esterilizada, manipueira filtrada e manipueira filtrada esterilizada. Todos esses meios de cultivo tiveram seu pH corrigido até 8,50 com solução de NaOH 10% (v/v). O pH após 15 dias de cultivo foi 9,03 para a manipueira bruta; 8,97 para a manipueira bruta esterilizada; 8,94 para a manipueira filtrada e 9,11 para a manipueira filtrada esterilizada. Após análise visual e observação em microscópio, constatou-se que no meio de cultivo constituído pela manipueira bruta, a *Spirulina platensis* (cepa PAR) não sobreviveu e que nos demais, apesar de apresentar poucas células ou presença de muitos micro-organismos contaminantes, a *Spirulina* permaneceu viva, conforme demonstrado na Figura 31, a seguir.

Fotobioreator com	Aspecto do fotobioreator ao final do cultivo	Imagem obtida no microscópio (aumento de 40 vezes)
Manipueira bruta		
Manipueira bruta esterilizada		



Figura 31 – Aspecto final dos cultivos preliminares em manipueira.

Com base nesses resultados, foi planejado outro experimento: três fotobioreatores (frascos erlenmeyer de 2L) com volume inicial de 1000 mL (meio Zarrouk a 20% e 10% de inóculo nesse volume), sendo adicionada gradualmente manipueira bruta esterilizada e manipueira filtrada *esterilizada* nos fotobioreatores 01 e 02, respectivamente, e meio Zarrouk a 20% no fotobioreator 03 (padrão). A cada quatro dias uma amostra de 50 mL de cada um dos fotobioreatores foi coletada e, uma nova porção de meio de cultivo (manipueira bruta, manipueira filtrada e Zarrouk 20%) previamente fracionada (em frascos com 50 mL), esterilizada e congelada a -20°C foi adicionada no respectivo fotobioreator, esperando-se constatar qual seria a proporção limite de manipueira adicionável e que limitasse o crescimento da *Spirulina*.

Os resultados da concentração de biomassa e conseqüentemente, a produtividade, foram positivos, além de apresentarem resultados superiores quando comparados com os cultivos realizados em meio Zarrouk (padrão). A *Spirulina* cultivada com adição regular de manipueira filtrada esterilizada (fotobioreator 01) chegou ao trigésimo quarto dia de cultivo com uma concentração de biomassa de $3,582 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e produtividade de $0,090 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, enquanto a

Spirulina cultivada com adição regular de manipueira bruta esterilizada (fotobioreator 02) chegou ao término do mesmo período com uma concentração de biomassa de $2,503 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e produtividade de $0,059 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. Isso que talvez as moléculas do amido, naturalmente presentes na manipueira e que gelatinizaram após a esterilização, influenciam negativamente a penetração da luz no fotobioreator 02.

Outra relação importante refere-se à obtenção de ficocianina, ou seja, no fotobioreator 01, a quantidade de ficocianina obtida foi maior ($0,186 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, no 28º dia de cultivo) quando comparada com o fotobioreator 02 ($0,169 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, no 14º dia de cultivo) e está diretamente relacionada com os momentos onde a produtividade de biomassa foi mais elevada, conforme demonstra a Figura 32.

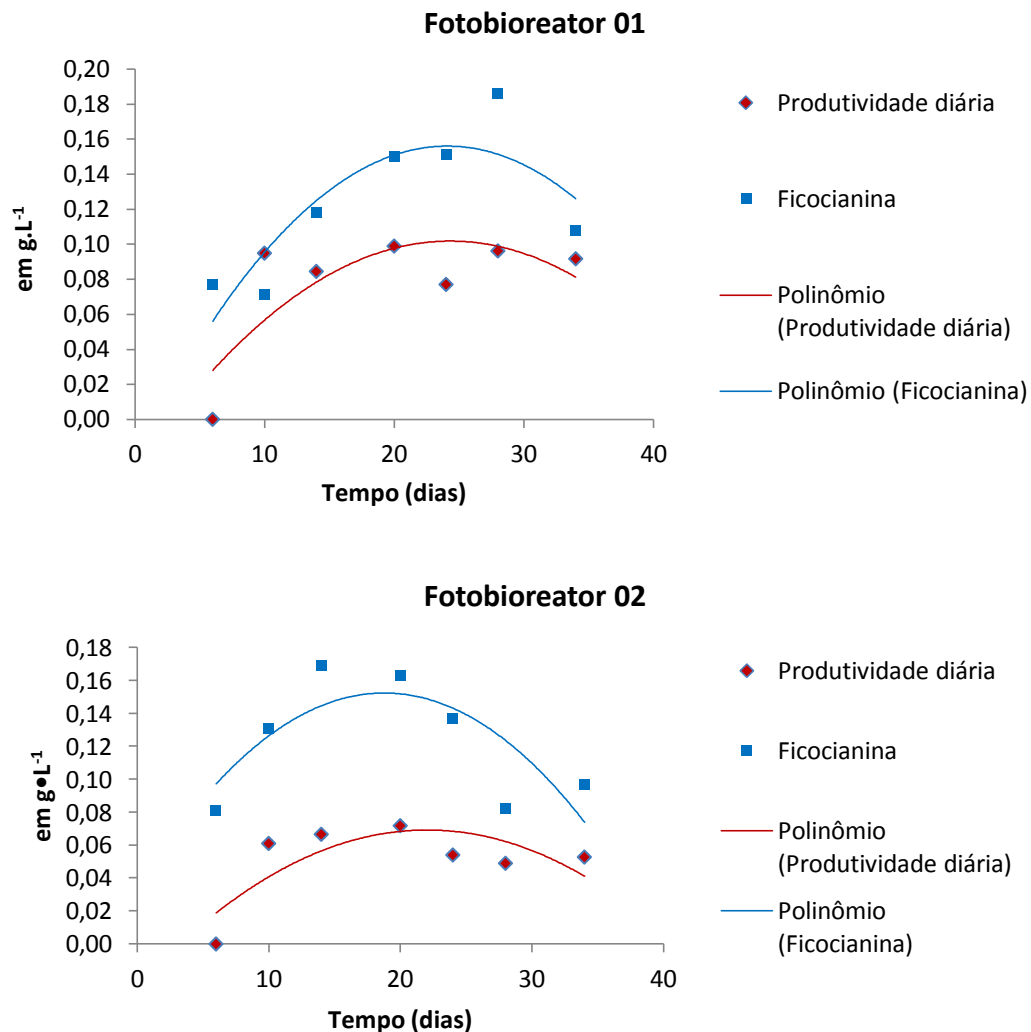


Figura 32 – Relação entre a produtividade e a quantidade de ficocianina obtida.

Considerando a ausência de dados na literatura a respeito do cultivo da *Spirulina platensis* em manipueira, foi desenvolvida a cinética 09, a qual foi realizada com a microalga *Chlorella vulgaris*. O objetivo dessa cinética era traçar um comparativo entre o desenvolvimento da biomassa de *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* cultivadas em manipueira, já que os estudos realizados por Borghetti (2009) com a microalga *Chlorella minutissima* foram iniciados e indicaram a possibilidade de cultivo nesse substrato.

A *Chlorella vulgaris* foi inoculada em três fotobioreatores com adição gradual de manipueira bruta esterilizada e manipueira filtrada esterilizada nos fotobioreatores 01 e 02, respectivamente, e meio ES no fotobioreator 03 (padrão). A cada quatro dias uma amostra de 50 mL de cada um dos fotobioreatores foi coletada e, uma nova porção de manipueira bruta, manipueira filtrada e meio ES, previamente fracionada (em frascos com 50 mL), esterilizada, congelada a -20°C e descongelada sob refrigeração foi adicionada no respectivo fotobioreator.

Os resultados obtidos para o período de 34 dias de cultivo estão na Tabela 21 e novamente há evidências de que a manipueira filtrada facilite a penetração da luz no fotobioreator, pois a concentração final de biomassa obtida no fotobioreator 02 foi 44% superior ao resultado obtido no fotobioreator 01. Anaga e Abu (1996) cultivaram *Chlorella* em efluente com altas taxas de PO_4^{-3} e NO_3^{-1} e obtiveram uma concentração de $6,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ou seja, superior à obtida num cultivo semelhante com *Spirulina*, porém, a cultura também pereceu em um curto período de cultivo.

Tabela 21 – Desenvolvimento da biomassa e produtividade da *Chlorella vulgaris* cultivada sob adição gradual de manipueira – cinética 09.

Fotobioreator	X_{inicial} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_{final} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	P ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$)
Fotobioreator 01 – Manipueira bruta	0,183	2,336	0,073
Fotobioreator 02 – Manipueira filtrada	0,143	3,383	0,100
Fotobioreator 03 – Meio ES (padrão)	0,166	1,336	0,023

Já a Figura 33 apresenta a relação entre a leitura periódica da absorbância das amostras do cultivo a 670 nm, a concentração celular com base na determinação da biomassa seca e o período onde a produtividade é máxima.

Sob essa ótica, pode-se definir qual seria o melhor momento para a colheita da biomassa, considerando aspectos como os custos de produção (energia, mão de obra, etc.) e a finalidade da produção: obtenção de lipídios ou como alimento funcional, por exemplo. A Figura 34

também apresenta o gráfico com o ponto de inflexão, ou seja, o momento em que a cultura passa a apresentar produtividade constante e deixa o estado de crescimento acelerado, neste caso, entre o 21º e o 24º dia de cultivo.

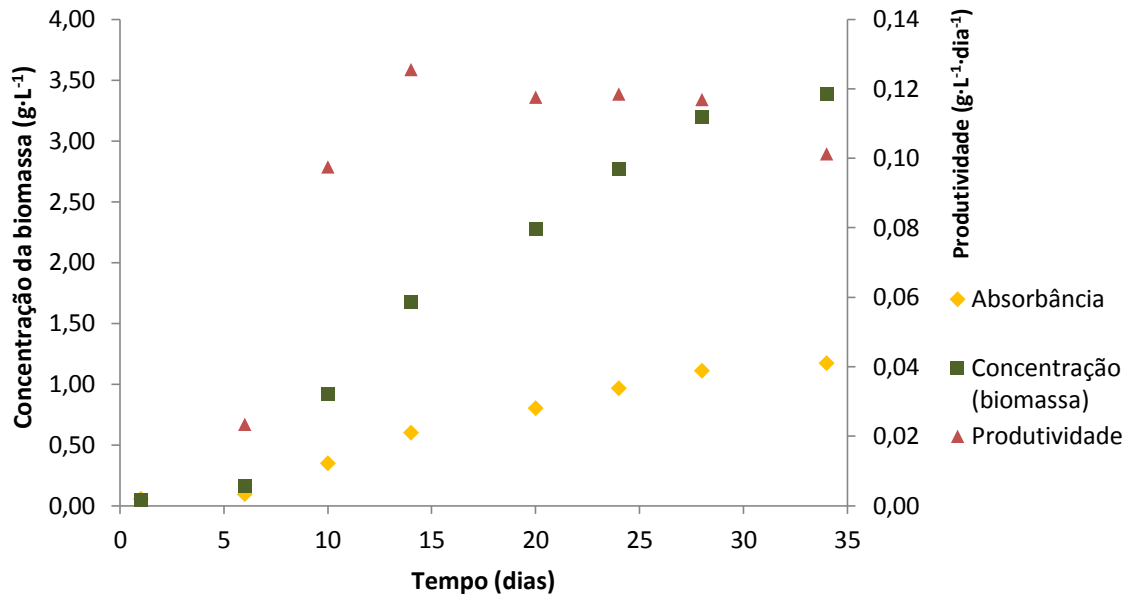


Figura 33 – Relação entre a leitura da absorbância, concentração da biomassa e produtividade no cultivo da *Chlorella vulgaris* em manipueira – cinética 09.

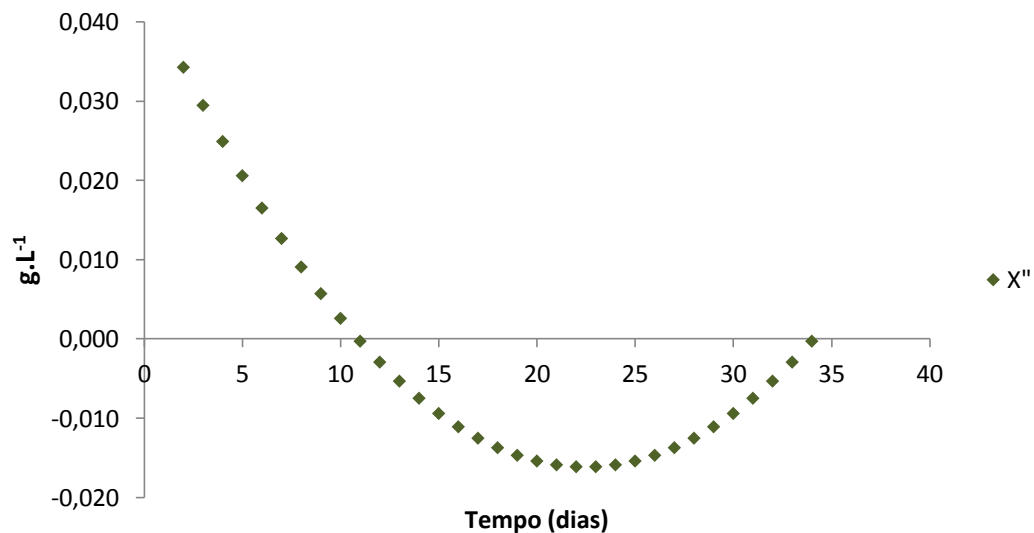


Figura 34 – Gráfico com o ponto de inflexão da *Chlorella vulgaris* em manipueira – Cinética 09.

Os resultados obtidos nessa cinética, principalmente para o cultivo realizado com manipueira filtrada, demonstram o alto rendimento da *Chlorella vulgaris* nesse meio de cultivo, superando inclusive os melhores resultados obtidos por Borghetti (2009) onde a maior concentração de biomassa ($X_{\text{máx}}$) da *Chlorella minutissima* obtida foi de $2,790 \text{ g.L}^{-1}$, porém inferior ao alcançado Costa *et al* (2006), que conseguiram biomassa ($X_{\text{máx}}$) de $5,06 \text{ g.L}^{-1}$ para a *Chlorella vulgaris* quando cultivada a 35°C , 2500 Lux , $16,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de NO_3 .

Tanto na cinética 08, quanto na cinética 09, os melhores resultados em termos de produtividade e concentração da biomassa foram obtidos através da utilização da manipueira filtrada. A realização de uma nova cinética (cinética 10), desta vez com o cultivo da *Spirulina platensis* PAR sob adição gradual de manipueira filtrada sem passar pelo processo de esterilização e com o incremento da densidade luminosa em 50% ($1,2 \text{ klux}$) buscou aproximar-se das condições reais de cultivo. Assim, seria possível estudar a resposta de crescimento da *Spirulina* na presença de contaminantes biológicos e químicos, como as toxinas naturalmente presentes nesse resíduo, além de uma maior disponibilidade de luz.

Os resultados também demonstraram uma boa adaptação da *Spirulina* às condições de cultivo, pois até o 13º dia, a concentração de biomassa foi ascendente e chegou ao valor máximo de $4,318 \text{ g.L}^{-1}$, momento em que se constatou a saturação do meio e a cultura entrou em crescimento desacelerado. A produtividade no período estudado foi de $0,335 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, porém, as maiores taxas de produtividade foram obtidas até o oitavo dia de cultivo, conforme demonstrado na Figura 35. Cultivos realizados por Andrade e Costa (2007) com *Spirulina* em melaço apresentaram concentração máxima de biomassa de $2,94 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade máxima de $0,32 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, ou seja, o cultivo realizado em manipueira apresentou concentração e produtividade superiores.

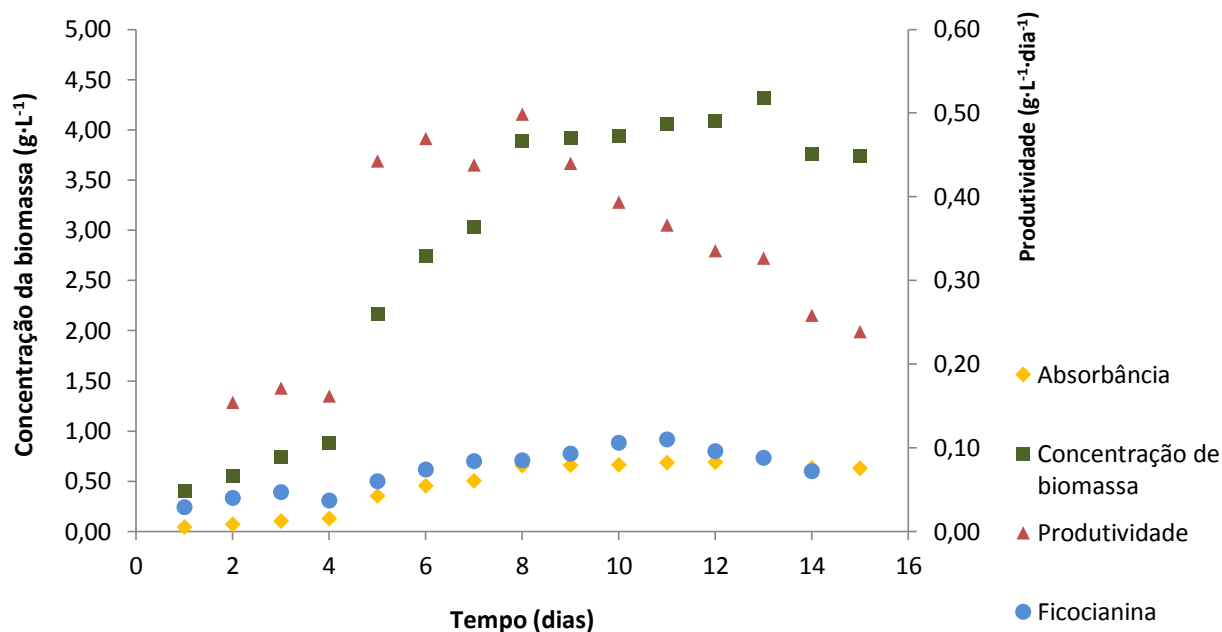


Figura 35 – Relação entre a leitura da absorbância, concentração da biomassa, produtividade e obtenção de ficocianina (em mg·mL⁻¹) no cultivo da *Spirulina platensis* PAR em manipueira não esterilizada – Cinética 10.

Da mesma forma que o cultivo com *Spirulina* foi testado em manipueira filtrada e não esterilizada e apresentou bons resultados, a cinética 11 foi desenvolvida como um padrão de comparação e envolveu o cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida inicialmente em meio ES e que recebeu adições graduais de 50,0 mL de manipueira filtrada e não esterilizada. A concentração inicial de biomassa, que era 0,644 g·L⁻¹, chegou ao máximo de 4,362 g·L⁻¹ no 12º dia de cultivo, que foi estendido até o 15º dia, quando já se observava a desaceleração no crescimento. A produtividade máxima (0,441 g·L⁻¹·dia⁻¹) foi atingida no oitavo dia de cultivo e ao final do período estudado, obteve-se uma média de 0,296 g·L⁻¹·dia⁻¹. A Figura 36 apresenta a relação entre a leitura da absorbância, a concentração de biomassa e a produtividade, no período.

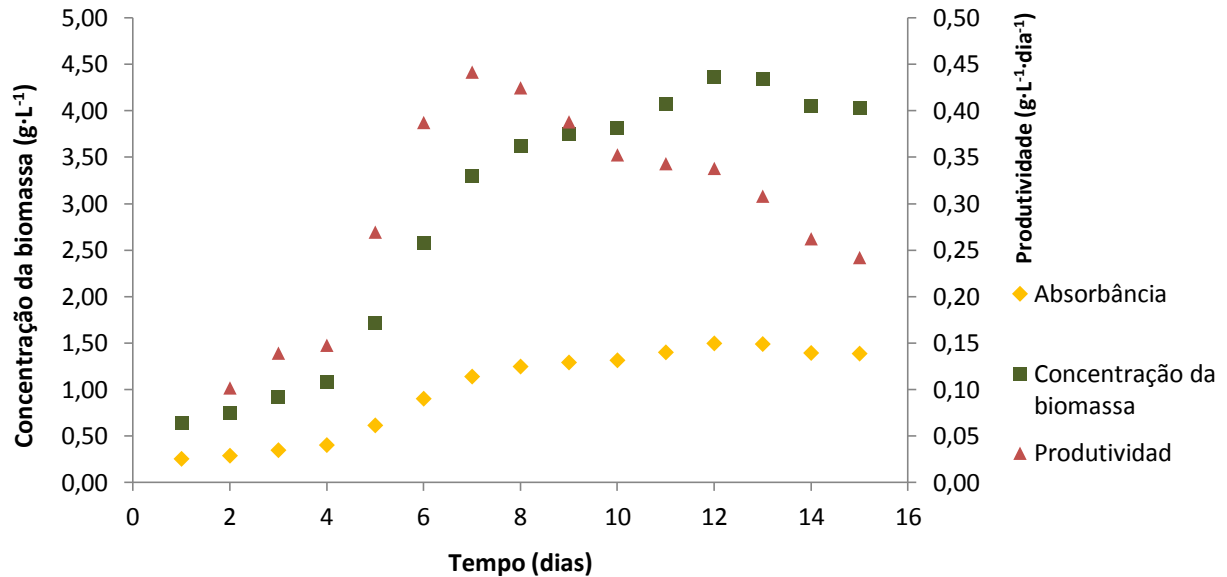


Figura 36 – Relação entre a leitura da absorbância, concentração da biomassa e produtividade no cultivo da *Chlorella vulgaris* em manipueira não esterilizada – Cinética 11.

A filtração de grandes volumes de manipueira para sua utilização como meio de cultivo das microalgas em escala ampliada pode apresentar dificuldades operacionais e encarecer o processo, visto que a concentração da manipueira é variável e o filtro pode apresentar rápida saturação. Uma alternativa que deve ser considerada no caso da implementação de um sistema para redução das partículas sólidas sedimentáveis, é a instalação de um tanque de decantação. Os testes realizados em escala piloto demonstraram que após seis horas, essas partículas estão completamente precipitadas e poderiam ser facilmente removidas, tornando a manipueira adequada para o cultivo da *Spirulina*, conforme pode ser observado na Figura 37.



Figura 37 – Aspecto da manipueira *in natura* e após filtração ou decantação por 6 horas

Por ser barata e de baixo custo operacional, a instalação de um tanque de decantação é uma alternativa viável na implementação dos sistemas de cultivo de microalgas como a *Spirulina platensis*, pois aliará o baixo custo para a redução na concentração de partículas sólidas sedimentáveis com o bom rendimento dos cultivos realizados nessa condição, apresentados nas cinéticas 08 e 10.

Em seguida, os resultados das operações empregadas na recuperação da biomassa e extração da ficocianina serão apresentados, levando-se em consideração principalmente a operacionalidade e os custos relacionados ao método empregado.

4.2 Recuperação da biomassa e extração da ficocianina

O método mais usual para recuperação da biomassa de *Spirulina* consiste na gravimetria com a utilização de centrífuga. Apesar disso, torna-se um processo dispendioso por envolver custos energéticos e operacionais que devem ser evitados. O fato do meio Zarrouk possuir alta concentração de sais diluídos pode provocar uma incorreta interpretação da concentração de biomassa obtida se esses sais não forem removidos corretamente, pois sua massa será somada à biomassa microalgal. A Figura 38 apresenta o fundo de um tubo falcon após centrifugação e secagem em estufa por 24 h, com o *pellet* de biomassa que não sofreu a lavagem dos sais, comparado com a imagem do *pellet* obtido após correta lavagem dos sais. O inconveniente dessa lavagem num processo produtivo é a grande quantidade de efluente líquido carregado de sais e com alto potencial poluidor de corpos d'água.



Figura 38 – *Pellet* de biomassa, após centrifugação e secagem.

Considerando a necessidade de redução no consumo de água e geração de efluente desse processo, assim como nos custos para a concentração da biomassa, já que o processo de centrifugação consome quantidade considerável de energia e tempo de centrifugação demasiado longo, o trabalho de Vandamme *et al*, (2010) realizou alguns testes com diferentes concentrações de floculantes orgânicos, como a quitosana e o amido e outros floculantes inorgânicos, como o sulfato de alumínio, o cloreto férrico.

Adicionalmente, poliacrilamidas sintéticas de alto peso molecular, alta carga catiônica e baixa ordem de toxicidade oral (Magnafloc 7995 e Zetag 8185, da Ciba Specialty Chemicals), usualmente aplicadas em sistemas de tratamento de águas e efluentes líquidos, também foram testadas. Todos os ensaios foram conduzidos à mesma temperatura (22°C) e com os floculantes concentrados a 1,0 mg·L⁻¹, 2,0 mg·L⁻¹ e 3,0 mg·L⁻¹. A cultura empregada nos testes foi de *Spirulina platensis* em meio Zarrouk (20% v/v) com concentração de biomassa de 0,6 g·L⁻¹.

Os resultados demonstraram que o produto Zetag 8185, concentrado a 1 ppm (1,0 mg·L⁻¹) apresentou resultado satisfatório para concentração e colheita da biomassa, provando ser potencialmente útil para a colheita da biomassa microalgal, pois quando comparado com floculantes inorgânicos, requer uma dose muito menor e forma rapidamente um bloco coeso de biomassa que facilita muito o processo posterior de extração do biopigmento. Além disso, sua aplicação na colheita de biomassa para a extração da ficocianina não representa um risco potencial de contaminação, uma vez que muitas das poliacrilamidas são produtos aprovados para uso em sistemas de tratamento de água, a afinidade eletrônica da poliacrilamida utilizada se dá com as estruturas celulares externas e não com as ficobilinas e, por formar um bloco coeso de biomassa, o volume no qual foi aplicada a solução tampão fosfato foi muito menor, gerando economia dessa solução e da energia necessária para as etapas subseqüentes da extração.

Do ponto de vista de rompimento celular, consideramos que o processamento usando congelamentos e descongelamentos sucessivos, embora eficiente, demanda tempo e energia. Para investigar a suscetibilidade das células ao rompimento mecânico, foi feito o ensaio de rompimento celular de *Spirulina platensis* PAR em homogeneizador de alta pressão, analisando-se o dano celular como consequência da pressão aplicada sobre a biomassa algal no equipamento. Essas amostras foram analisadas por microscopia, imediatamente após o rompimento e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro para determinação da

ficocianina e seu grau de pureza. Para efeitos de comparação, realizou-se a extração de ficocianina pelo método tradicional. A temperatura de rompimento foi de 24°C e com a uma alíquota retirada de cada extração, foi realizado um "pool" e reprocessado em um novo passe no homogeneizador a 300 atm (sobra). A Figura 39 apresenta um gráfico com a relação dano celular x pressão aplicada no equipamento e a comparação com o método padrão de rompimento celular.

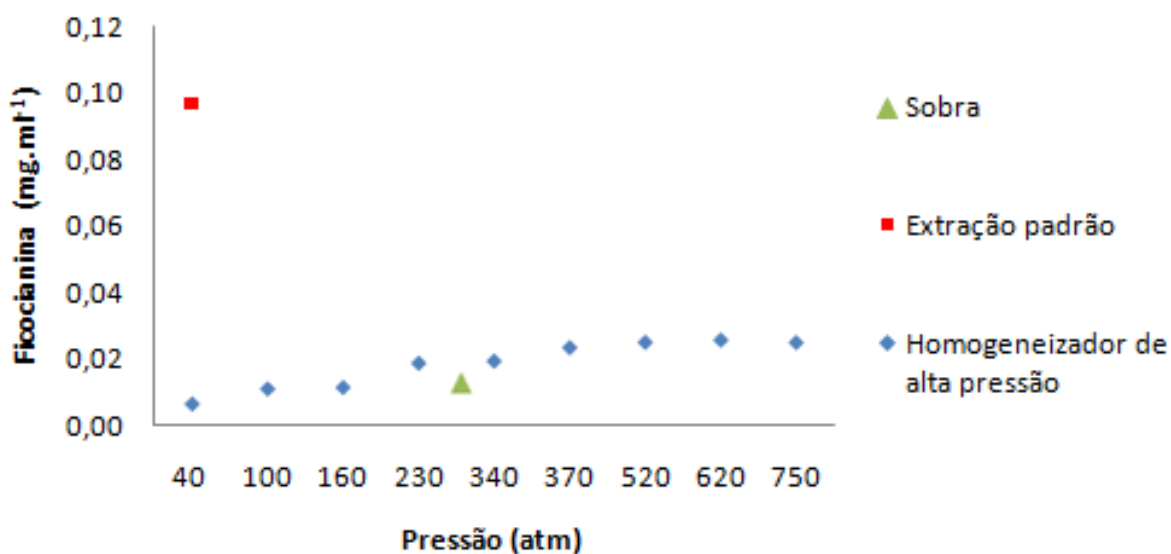


Figura 39 – Relação dano celular x pressão aplicada e o comparativo com método padrão.

Os resultados do rompimento com o homogeneizador de alta pressão não foram satisfatórios se comparados com o método padrão de rompimento celular (ciclos de congelamento e descongelamento), conforme demonstrado anteriormente. Por outro lado, é possível visualizar na Figura 40 o aumento gradativo do rompimento das células com a pressão:

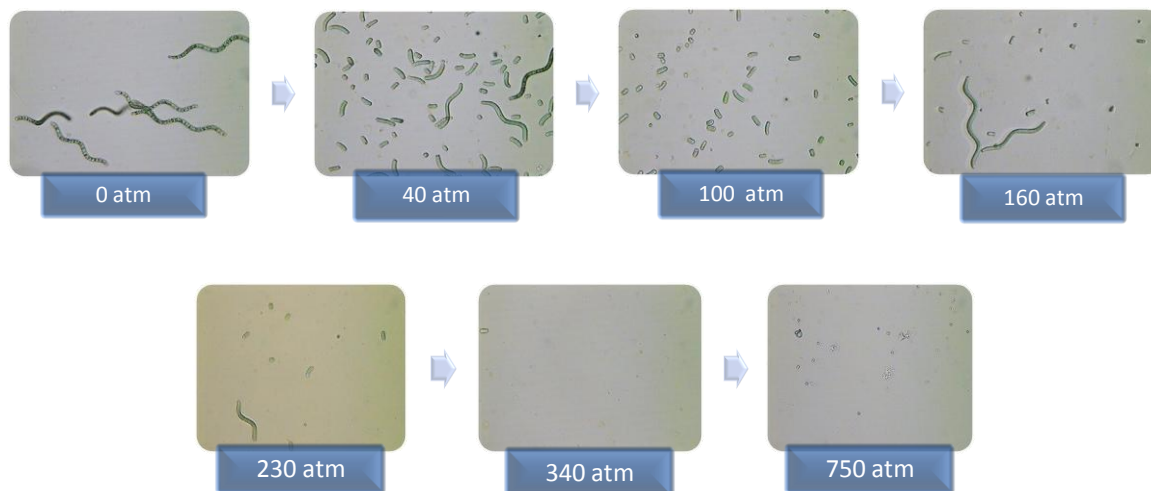


Figura 40 – Característica do rompimento celular.

Assim como os resultados obtidos por Silva (2008) num ensaio de rompimento com o homogeneizador de alta pressão, é possível detectar que a ruptura celular aumenta e conseqüentemente a obtenção de ficocianina até cerca de 230 atm de pressão e para pressões acima desse valor, observa-se uma tendência à estabilização na quantidade de ficocianina extraída. No entanto, mesmo as melhores condições de rompimento ainda são inferiores ao processamento com congelamento e descongelamento.

4.3 Purificação da ficocianina

Alguns ensaios realizados comprovaram que a concentração da ficocianina diluída em meio aquoso pode ser realizada através da adição de diferentes volumes de uma solução saturada de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) para alcançar percentagens entre 20 e 70 % (v/v) de solução adicionada, mas que os melhores resultados seriam obtidos através de uma precipitação fracionada de 30% seguida de 60% de solução saturada adicionada (Silveira, 2007; Silva, 2008).

Após a precipitação com 60% de solução saturada adicionada, os melhores graus de pureza obtidos foram: 1,06 (cinética 01, cepa PAR) e 1,10 (cinética 03, reator sob o filme vermelho). Já os cultivos realizados com efluente de indústria processadora de produtos cárneos (cinética 07) apresentaram grau de pureza máximo de 0,26 (cultivo com efluente a 10%) e os cultivos realizados com manipueira nas cinéticas 08 e 10 apresentaram grau de pureza máximo de 0,60, ou seja, apenas a ficocianina obtida nos cultivos 01 e 03 poderia ser considerada de grau alimentício.

Outras etapas de purificação foram relatadas por Eriksen (2008-b) e envolvem métodos cromatográficos, que no trabalho de Zhang e Chen (1999-b) alcançaram grau de pureza 5,06; métodos de extração aquosa de duas fases, que atingiram grau de pureza 5,1 por Patil *et al*, (2006) e sistemas combinados entre métodos cromatográficos e métodos de extração aquosa de duas fases, que no mesmo estudo de Patil *et al*, (2006) atingiram grau de pureza de 6,69 para a ficocianina.

Com base nos relatos de bons resultados obtidos na purificação de ficocianina através dos sistemas de duas fases aquosas (SDFA), foi executado o planejamento experimental envolvendo sistemas PEG-Fosfato. O processo de diálise ao qual a amostra foi submetida serviu para reduzir a interferência dos sais existentes no extrato protéico (pigmento) na etapa seguinte que é a formação das fases, assim como melhorar a precisão no preparo das amostras submetidas aos sistemas. O conteúdo protéico da amostra após a diálise foi determinado e constatou-se a presença de $20,41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, indicando a necessidade de diluição do extrato protéico até uma relação de $0,50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Essa diluição é indicada como forma de padronização, favorecendo a migração das proteínas dentro do sistema bifásico, bem como à leitura da absorbância das fases formadas, já que a ficocianina sob altas concentrações impossibilitaria a determinação da absorbância das amostras em espectrofotômetro.

No caso SDFA, todos os sistemas tiveram seus resultados analisados com base no volume formado nas fases superior e inferior (*top* e *bottom*, respectivamente), assim como a quantificação proteica total através do método Bradford para cada uma das fases formadas e que está na Tabela 22. O coeficiente de partição em proteínas totais, o balanço de massa em proteínas totais e o rendimento da extração protéica foi determinado.

Além disso, os pigmentos ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina presentes nas fases foram determinados por turbidimetria e cálculo através das equações 1, 2 e 3, respectivamente.

O fator de purificação foi determinado a partir da relação entre a concentração de pigmento obtida na fase *top*, e a concentração do pigmento antes de submetê-lo ao SDFA e também está relacionado na Tabela 22, indicando quantas vezes o extrato de ficocianina foi purificado através do SDFA. O coeficiente de partição k_p em relação aos pigmentos, assim como o balanço de massa dos pigmentos foram determinados e utilizados para a análise estatística. A Figura 41 apresenta o aspecto da amostra padronizada e as fases formadas, em cada uma das condições testadas no planejamento experimental.

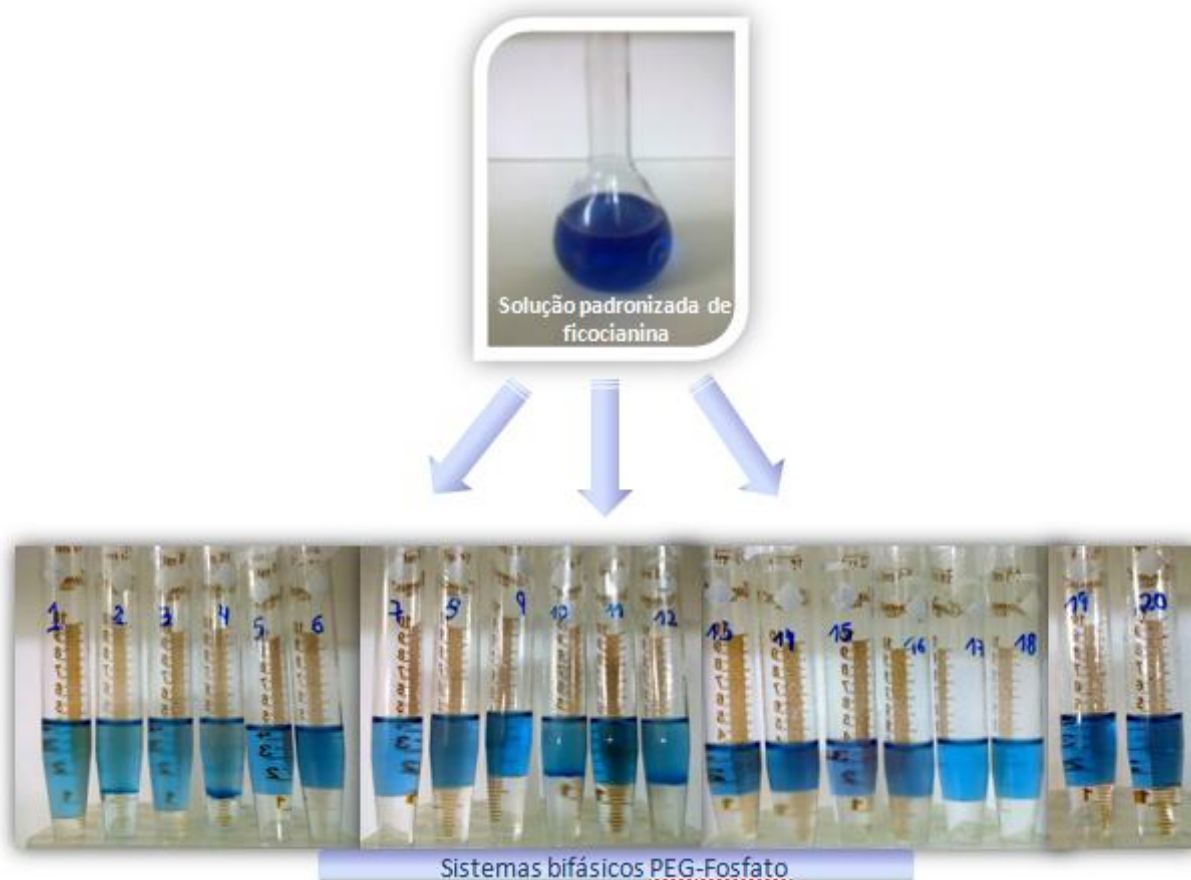


Figura 41 – Amostra padronizada e as fases formadas no planejamento.

Tabela 22 – resumo dos resultados obtidos: volume formado nas fases, concentração de proteínas em cada fase e fator de purificação da alofocianina (AFC) e da ficocianina (FC) obtidos sobre o extrato inicial.

Sistemas					Volumes formados (mL)		Proteínas (g·L ⁻¹)		Fator de Purificação (PEG)	
Exper.	MM _{PEG}	C _{PEG}	pH	C _{Fosfato}	PEG (TOP)	SAL (BOTTOM)	PEG	SAL	AFC	FC
1	1000	21	6	10	3,6	0,6	0,091	0,013	1,85	1,15
2	3000	21	6	10	2,9	1,2	0,058	0,051	0,37	1,63
3	1000	25	6	10	3,5	0,9	0,078	0,015	0,55	1,40
4	3000	25	6	10	3,1	1,0	0,042	0,029	0,66	2,28
5	1000	21	8	10	2,9	1,5	0,123	0,013	0,20	0,84
6	3000	21	8	10	2,6	1,7	0,143	0,026	0,33	0,81
7	1000	25	8	10	3,0	1,2	0,119	0,026	0,19	0,76
8	3000	25	8	10	2,8	1,5	0,091	0,019	0,59	1,14
9	1000	21	6	14	2,4	1,4	0,121	0,017	0,38	1,16
10	3000	21	6	14	2,2	1,6	0,036	0,017	1,56	2,67
11	1000	25	6	14	2,7	1,5	0,079	0,003	0,71	1,64
12	3000	25	6	14	2,7	1,5	0,072	0,016	0,95	1,22
13	1000	21	8	14	2,1	1,6	0,146	0,014	0,25	0,76
14	3000	21	8	14	2,1	1,9	0,134	0,024	0,53	0,93
15	1000	25	8	14	2,4	1,6	0,139	0,007	0,71	0,71
16	3000	25	8	14	2,4	1,7	0,064	0,010	1,31	1,58
17	1500	23	7	12	2,7	1,5	0,117	0,030	0,47	1,15
18	1500	23	7	12	2,7	1,5	0,111	0,025	0,50	1,19
19	1500	23	7	12	2,7	1,5	0,104	0,019	0,64	1,31
20	1500	23	7	12	2,7	1,5	0,130	0,026	0,51	1,06

Onde: MM_{PEG} = massa molar do PEG (Sigma); C_{PEG} = concentração do PEG (base 100) e C_{Fosfato} = concentração do fosfatos (base 100).

O gráfico de Pareto dos efeitos principais (Figura 42), realizado a partir de quatro variáveis em dois níveis e tendo como variável-resposta o coeficiente de partição (kp), demonstra que não houve variáveis com efeitos significantes ao nível de $p = 0,5$.

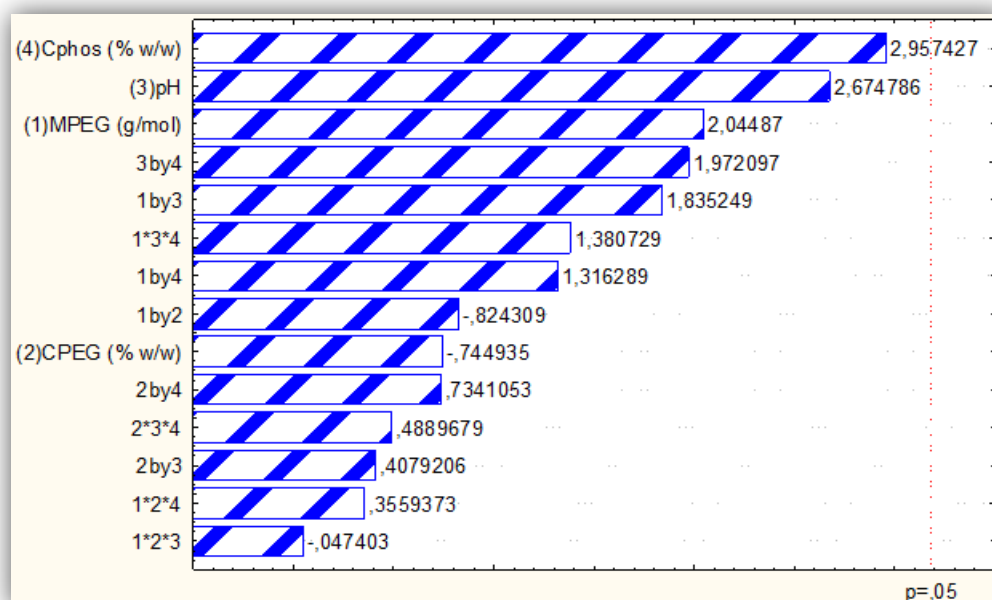


Figura 42 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição k_p e o efeito estimado (valor absoluto) na abscissa.

Onde: Cphos – concentração de fosfato; MPEG – massa molar do PEG; CPEG – concentração do PEG

Já o gráfico de Pareto dos efeitos principais (Figura 43), realizado a partir de quatro variáveis em dois níveis e tendo como variável-resposta a recuperação da ficocianina (FC), demonstra que houve variáveis com efeitos significantes ao nível de $p = 0,5$. Nesse caso, a combinação do quociente entre (1) MPEG e (3) pH é a variável de maior efeito positivo para a recuperação da ficocianina, seguida pela (4) Cphos, (1) MPEG, (3) pH 3 e do quociente entre (2) CPEG e (3) pH 3, que por sua vez possuem efeitos negativos.

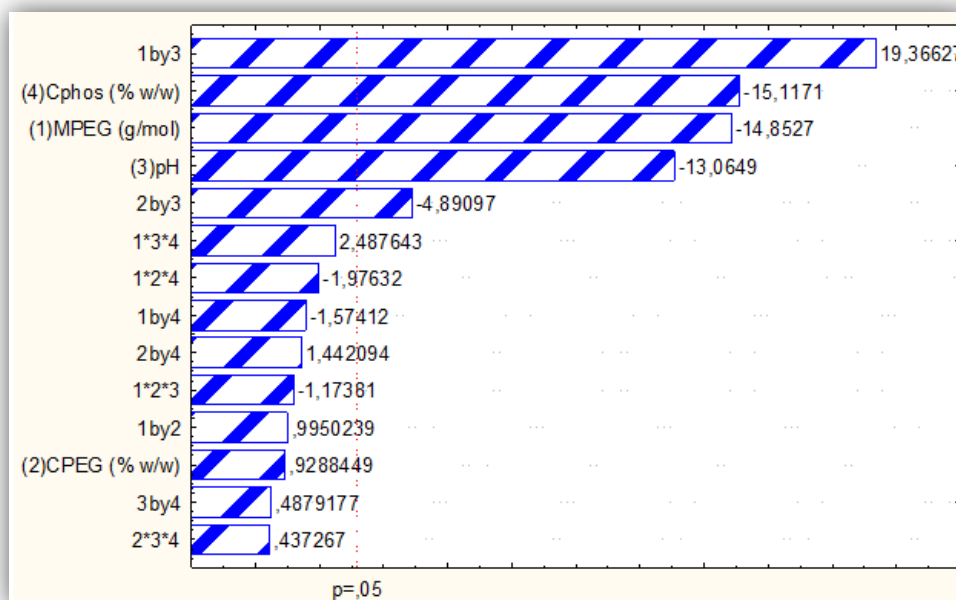


Figura 43 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da ficocianina (FC) e o efeito estimado (valor absoluto) na abscissa. Onde: Cphos – concentração de fosfato; MPEG – massa molar do PEG; CPEG – concentração do PEG.

A Figura 44 apresenta o diagrama para interpretação geométrica do planejamento realizado, considerando a variável resposta o fator de recuperação de ficocianina, e a variável de maior efeito constatada na Figura anterior, a qual envolve a relação entre (1) MPEG e (3) pH. Nesse caso, é facilmente detectável que o ponto de maior efeito é aquele obtido quando (1) MPEG e (3) pH são utilizados com os menores valores estabelecidos no planejamento, ou seja, pH 6,0 e MPEG de $3000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

O gráfico de Pareto dos efeitos principais (Figura 45), realizado a partir de quatro variáveis em dois níveis e tendo como variável-resposta o fator de purificação da ficocianina (FC), demonstra que houve variáveis com efeitos significantes ao nível de $p = 0,5$. A variável com maior efeito positivo na purificação da ficocianina é a (1) MPEG, seguida pela relação entre (2) CPEG, (3) pH e (4) Cphos, depois pela combinação entre (1) MPEG com (2) CPEG e (3) pH e depois o quociente (2) CPEG por (3) pH, quociente (1) MPEG por (4) Cphos e a variável (4) Cphos. As variáveis identificadas com os maiores efeitos negativos são o (3) pH, depois a combinação entre (1) MPEG, (2) CPEG e (4) Cphos, seguido pelo quociente (1) MPEG por (3) pH, (2) CPEG por (4) Cphos e (1) MPEG por (2) CPEG.

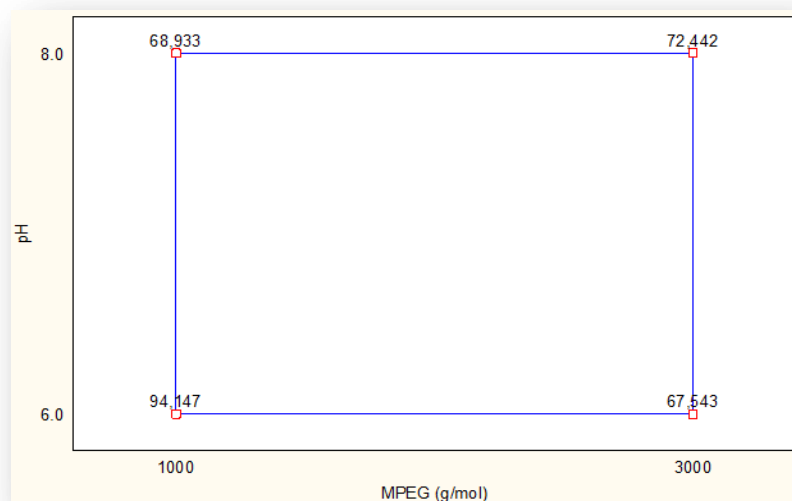


Figura 44 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta a recuperação de ficocianina para analisar o pH em função da massa molar do PEG (MPEG).

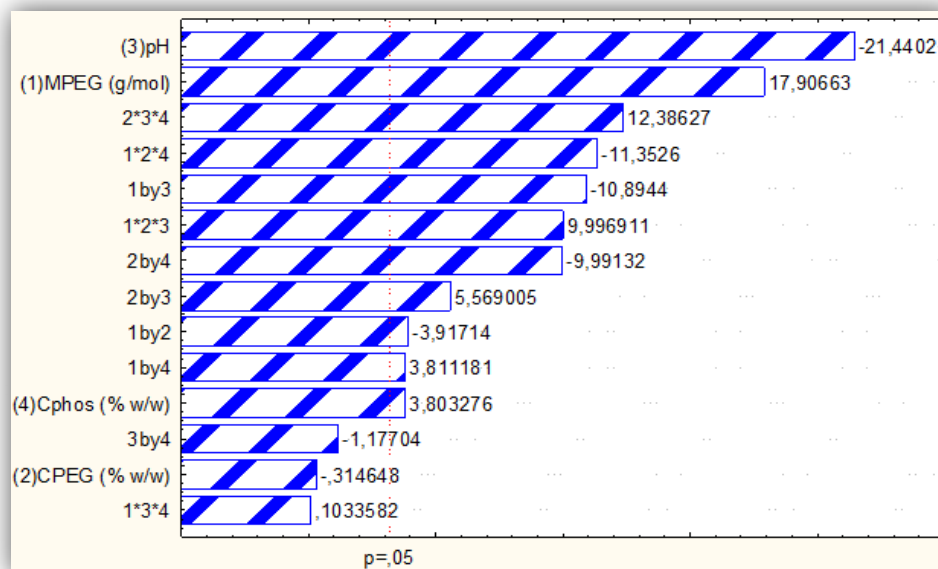


Figura 45 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o fator de purificação de ficocianina (FC) e o efeito estimado (valor absoluto) na abscissa. Onde: Cphos – concentração de fosfato; MPEG – massa molar do PEG; CPEG – concentração do PEG.

A Figura 46 representa um cubo, no qual as três principais variáveis estão correlacionadas (pH, CPEG – Concentração do PEG e Cphos – Concentração do Fosfato). Esta análise

relaciona as variáveis para a resposta fator de purificação da ficocianina e a melhor condição relativa (4,286) encontrada para as três variáveis foi obtida com o pH 6,0, CPEG 21% (v/v) e Cphos 14% (v/v), ou seja, seria o sistema 10 do planejamento expresso na Tabela 22.

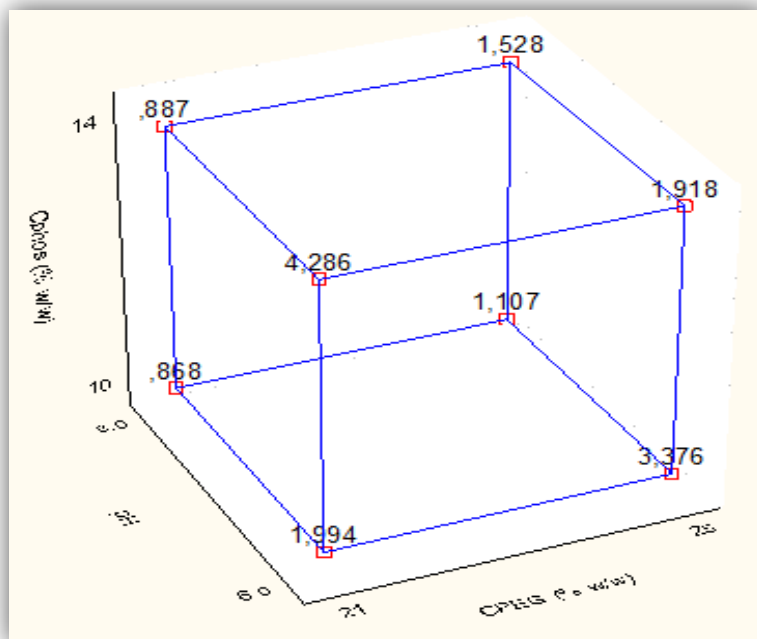


Figura 46 – Cubo com correlação entre as principais variáveis para a melhor resposta de fator de purificação da ficocianina.

Já na Figura 47, o diagrama para interpretação geométrica do planejamento realizado, considerando a variável resposta fator de purificação de ficocianina, relaciona a variável de maior efeito constatada na Figura 45, que é (1) MPEG quando ele é máximo ($3000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) e o (3) pH, que é 6,0.

Ao considerarmos a análise estatística realizada e a variável mais importante, que é a obtenção de um maior fator de purificação da amostra, o melhor sistema para purificação da ficocianina seria o sistema 10 (ver Tabela 22), pois engloba o pH 6,0 e MPEG de $3000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ representados na Figura 44, assim como a melhor condição relativa (4,286) encontrada para as outras três variáveis, obtida com o pH 6,0, CPEG 21% (v/v) e Cphos 14% (v/v).

Uma vez que o fator máximo de purificação para a ficocianina obtido no sistema 10 é 2,67, a aplicabilidade do SDFA deverá ser avaliada levando-se em conta os custos para realização desse sistema e o valor comercial do produto purificado, em conformidade com a sua finalidade.

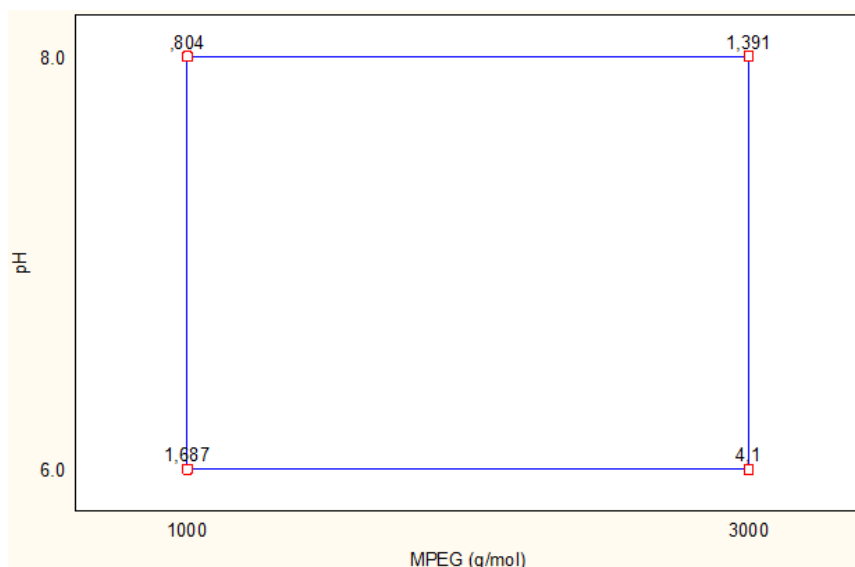


Figura 47 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta o fator de purificação de ficocianina para analisar o pH em função da massa molar do PEG (M_{PEG}).

Tão importante quanto a purificação da ficocianina obtida, a preservação por longos períodos das cepas de *Spirulina* devidamente identificadas e com as características mais adequadas às condições de cultivo faz-se necessária. Entretanto, a reconhecida dificuldade para conservação dessa microalga precisou ser estudada e uma alternativa para sua boa conservação foi estabelecida e descrita a seguir.

4.4 Preservação das cepas de interesse

O estudo das técnicas de preservação da microalga *Spirulina* foi realizado com o objetivo de determinar um método eficaz para armazenamento e conservação das cepas de interesse, considerando a dificuldade existente na preservação desse micro-organismo sob diferentes condições, representada pela baixa viabilidade de suas células após períodos de congelamento ou criopreservação.

A escolha do crioprotetor a ser utilizado foi baseada em testes com diferentes concentrações de produtos citados na literatura, como o Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e metanol. Os resultados preliminares baseados na viabilidade celular indicaram a continuidade da utilização apenas de DMSO como agente crioprotetor para as demais etapas do estudo, pois as culturas nas quais se aplicou glicerol e metanol, não foram encontradas células viáveis.

As condições testadas e descritas no item 3.4.3 e que foram denominadas Controle, Condição 01, Condição 02, Condição 03, Condição 04 e Condição 05, tiveram suas células viáveis verificadas e contadas pelo método alternativo ao realizado em câmara de Neubauer, onde a viabilidade foi definida após a contagem dos tricomas íntegros presentes num volume conhecido, obtido com auxílio de uma micropipeta sobre uma lâmina de vidro. A imagem com células viáveis, obtida através dessa técnica é exemplificada na Figura 48. Já a Figura 49 exemplifica alguma amostra da condição onde não foi detectada viabilidade celular, pois não há tricomas íntegros.

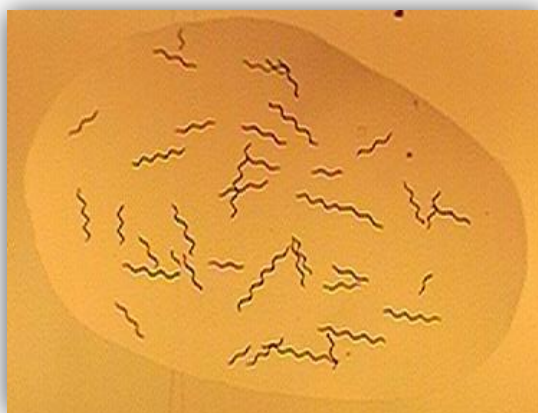


Figura 48 – Presença de tricomas da *Spirulina platensis* após a etapa de criopreservação.

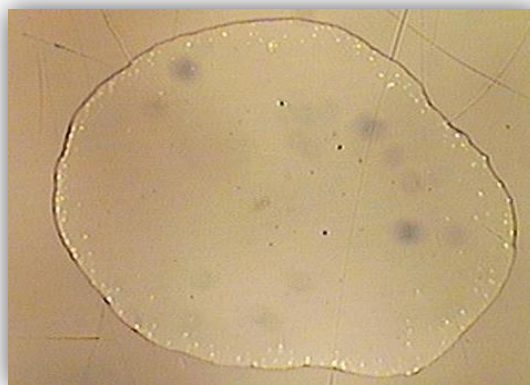


Figura 49 – Ausência de tricomas da *Spirulina platensis* após a etapa de criopreservação.

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado no início e no final de cada estágio de escala, sendo que no primeiro estágio o método alternativo de contagem de células foi empregado, no segundo estágio foi utilizada a leitura de absorbância e no terceiro estágio a biomassa foi avaliada por gravimetria. O cultivo controle, para comparação entre as metodologias de avaliação de crescimento celular, demonstrou que até no 15º dia houve crescimento significativo, representado em todos os métodos. Isso era esperado, pois conforme a literatura, a fase exponencial de crescimento da *Spirulina* ocorre, em média, até esse momento. A partir daí, a concentração de biomassa e a contagem do número de células decresceram, enquanto a absorbância ainda teve um leve aumento, possivelmente devido ao rompimento celular e liberação de pigmentos dessas células colapsadas. A Figura 50 retrata o observado no experimento.

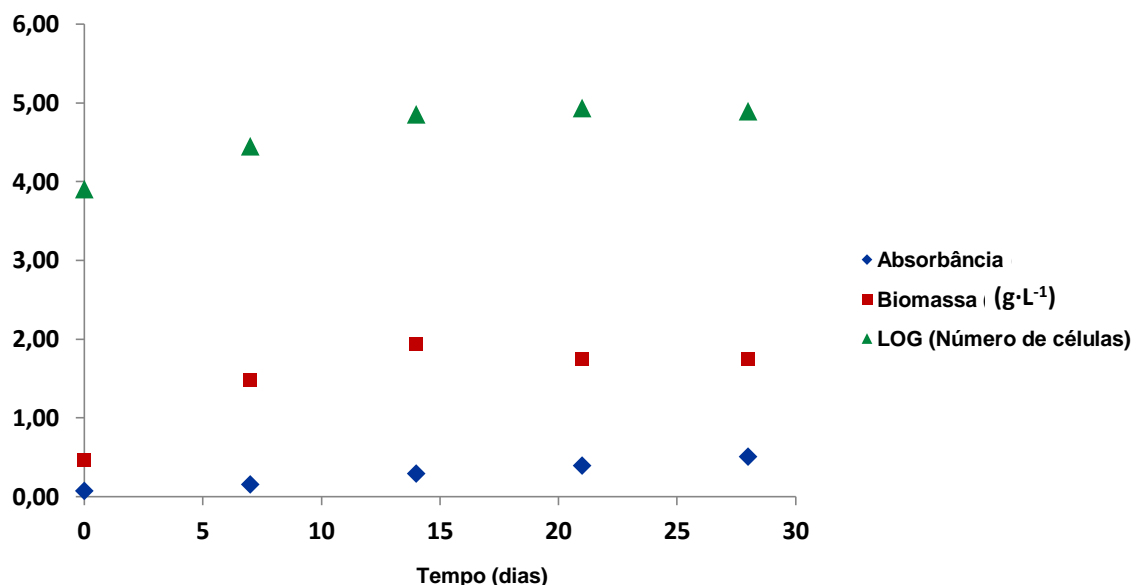


Figura 50 – Gráfico comparativo entre três diferentes métodos para acompanhamento do crescimento celular do cultivo de controle: absorbância, gravimetria (biomassa seca) e contagem de células.

Dentre as condições testadas, a análise da viabilidade foi conduzida em conformidade com o método de acompanhamento do crescimento empregado – células viáveis, absorbância e biomassa – já descritos. Os resultados obtidos estão na Tabela 23.

Tabela 23 – Comparativo entre os três métodos de acompanhamento do crescimento celular nas diferentes condições.

Condição	Células viáveis -mL ⁻¹	Absorbância	Biomassa (g·L ⁻¹)
Controle	6,40 x 10 ⁴	0,262	1,37
	1,42 x 10 ⁵	0,315	2,02
01	3,60 x 10 ³	0,147	0,80
	3,00 x 10 ⁴	0,145	1,27
02	-	0,056	-
	-	0,010	-
03	1,72 x 10 ⁴	0,167	1,08
	7,64 x 10 ⁴	0,178	1,79
04	-	0,050	-
	-	0,242	-
05	4,40 x 10 ³	0,190	0,81
	2,72 x 10 ⁴	0,295	0,94

Nota: para cada condição testada, foi tomada uma medida na fase inicial e outra após 12 dias de cultivo.

Observou-se que para a condição de congelamento a -18°C (condição 01) muitas células sofreram rompimento e mesmo após a reativação das culturas em meio basal, a presença de células rompidas permaneceu. Entretanto, o aumento da absorbância foi observado, assim como o aumento da concentração de biomassa. Em especial a metodologia alternativa de quantificação de células viáveis apresentou aumento, sendo que esse foi caracterizado como o maior entre as condições testadas.

Na condição de congelamento a -80°C (condição 02) observou-se desde o início uma coloração menos intensa e não característica num cultivo de *Spirulina*, sendo que após o descongelamento não foram observadas células viáveis, também, não houve aumento nos valores de absorbância no cultivo e consequentemente, não houve biomassa a ser quantificada.

A condição de criopreservação (Condição 03) demonstrou viabilidade especialmente após a quantificação pelo método gravimétrico, pois apresentou o maior aumento de biomassa. Os outros dois métodos também comprovaram a existência de crescimento celular e particularmente, na observação microscópica, poucas células rompidas foram observadas, demonstrando um maior sucesso desse método de preservação. A condição 04, apesar de apresentar um aumento na absorbância, não apresentou biomassa a ser quantificada nem

sequer células viáveis, sendo que a coloração da cultura atingiu um padrão amarelado e que não é característico de *Spirulina*.

Finalmente, a condição 05 mostrou-se também viável já que apresentou crescimento celular nos três métodos de acompanhamento do crescimento, merecendo destaque para a quantificação por absorbância, já que nessa condição foi atingido o maior aumento nesse parâmetro. No entanto, a observação de células viáveis mostrou muitas células fragmentadas tanto no início quanto ao final do estágio analisado.

Teoricamente uma única célula viável seria suficiente, porém, alguns autores definem que a viabilidade mínima aceitável, obtida pela razão entre a contagem de células pós-tratamento e a contagem de células antes do tratamento, deve ser de no mínimo 60% (MORRIS, 1981 e ANDERSEN, 2005). A condição 01 apresentou 5,6% de viabilidade, a condição 03 apresentou 26,9% e a condição 05 proporcionou viabilidade de 6,9%.

O estudo revelou ainda que há relação entre a viabilidade celular e a temperatura de armazenamento das células, ou seja, a manutenção da temperatura vítrea de transição ou a temperatura de transformação vítrea (T_g), é considerada crítica para a criopreservação, portanto, manter temperaturas mais baixas do que T_g pode influenciar na viabilidade das células. Isso explica o fato das condições 02 e 04 não terem sido bem sucedidas, pois na condição 02, as células foram congeladas e mantidas a -80°C e na condição 04, elas foram congeladas a -18°C e após 24 h, transferidas para armazenamento a -80°C .

Por outro lado, na condição 03, onde a *Spirulina* foi concentrada, posteriormente congelada e mantida a -196°C , os resultados de viabilidade da Tabela 23 foram superiores, sendo essa a condição indicada para a conservação da *Spirulina platensis*.

Tanto quanto a conservação da *Spirulina*, o emprego da ficocianina em diferentes produtos precisa ser melhor compreendido e testado. Nesse sentido, o próximo item descreve os resultados obtidos após alguns testes realizados em dois alimentos com características funcionais e destinados ao consumo humano.

4.5 Ensaios de conservação da ficocianina em alimentos

A aplicabilidade da ficocianina, assim como sua conservação foi testada por meio da adição de uma solução aquosa concentrada de ficocianina em amostras de leite fermentado sabor natural contendo probióticos do gênero *Bifidobacterium* e leite fermentado sabor natural, parcialmente desnatado, contendo probióticos do gênero *Lactobacillus*. As alíquotas com solução aquosa de ficocianina foram adicionadas em doses relativamente elevadas, porém, o objetivo do experimento era verificar o potencial de uso do ponto de vista da degradação do pigmento (descoloração ou desnaturação), formação de fases (sobrenadante, precipitado) ou alguma outra alteração não prevista.

As Figuras 51 e 52 apresentam o aspecto do produto no final do período estudado, salientando-se que não foram detectadas alterações significativas.



Figura 51 – Aspecto final das amostras de leite fermentado sabor natural contendo probióticos do gênero *Bifidobacterium*.



Figura 52 – Amostras com leite fermentado sabor natural, parcialmente desnatado, contendo probióticos do gênero *Lactobacillus*.

A Figura 53, a seguir, apresenta as leituras da absorbância no comprimento de onda característico da ficocianina. Há pequenas variações nos resultados medidos, possivelmente decorrentes de interferentes como diluições, pesagens ou leituras, porém, nenhuma delas é significativa ou indicativa da degradação do biopigmento.

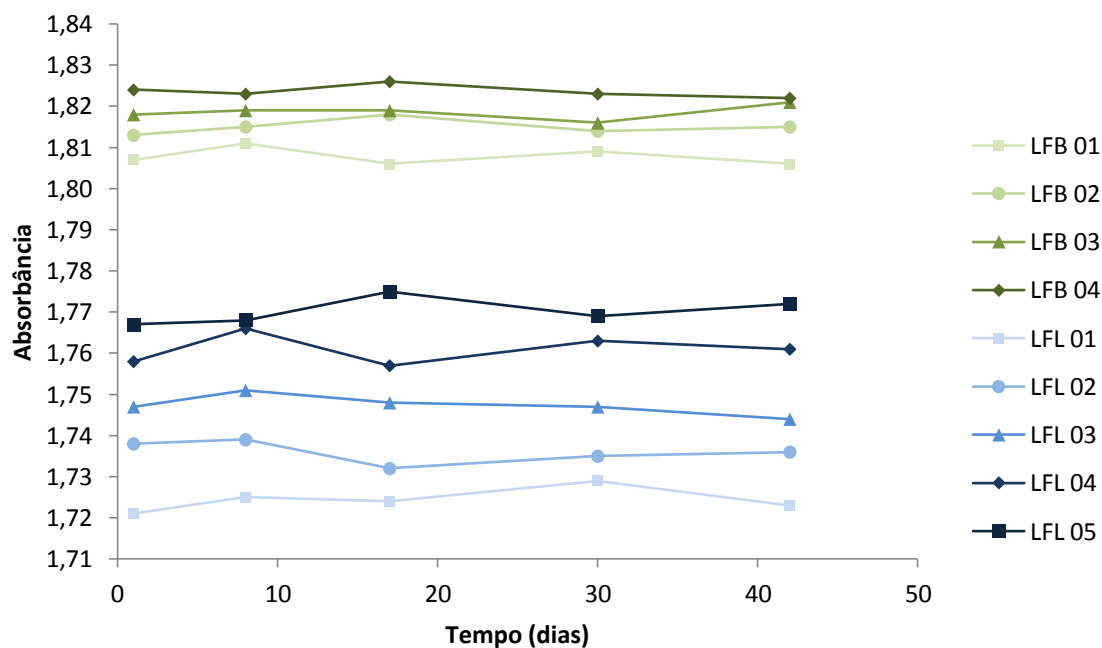


Figura 53 – Acompanhamento da degradação da ficocianina pela leitura da absorbância nas amostras de bebida láctea com *Bifidobacterium* (LFB) e *Lactobacillus* (LFL).

A legenda da Figura 53 apresenta a seguinte codificação:

a) amostras com 10,0 g de leite fermentado sabor natural (pH 3,3), contendo probióticos do gênero *Bifidobacterium* que receberam, respectivamente, doses de 0,1 g (LFB 01); 0,2 g (LFB 02); 0,3 g (LFB 03) e 0,4 g (LFB 04) da solução de ficocianina;

b) amostras de 10,0 g de leite fermentado sabor natural, parcialmente desnatado (pH 2,9), contendo probióticos do gênero *Lactobacillus* que receberam, respectivamente, doses de 0,1 g (LFL 01); 0,2 g (LFL 02); 0,3 g (LFL 03); 0,4 g (LFL 04) e 0,5 g (LFL 05) da solução de ficocianina.

Apesar da opacidade do leite fermentado, não foi considerada outra técnica para acompanhamento, como o colorímetro, porque para todas as leituras da absorbância eram realizadas com as amostras diluídas com a mesma proporção de água.

Os resultados demonstraram que, apesar de alguns autores relatarem a instabilidade e possível degradação do pigmento sob baixo pH, no período de testes e que compreendeu o período de validade do produto, não houve degradação da ficocianina, pois nem pela constatação visual (Figuras 51 e 52), nem pelas leituras da absorbância (Figura 53), foram detectadas alterações significativas (SARADA *et al*, 1999; SILVA, 2008; Antelo *et al*, 2008).

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O estudo do processo biotecnológico para produção de biomassa e extração da ficocianina, a partir da microalga *Spirulina platensis* e sob diferentes condições de cultivo foi realizado e possibilitaram as conclusões e sugestões destacadas a seguir:

5.1 Conclusões

5.1.1 O fenômeno da adaptação cromática complementar ocorre na *Spirulina platensis*.

Os resultados das cinéticas realizadas demonstraram a influência da adaptação cromática complementar da *Spirulina platensis* na produção de biomassa e de ficocianina. Os fotobioreatores onde o espectro luminoso foi manipulado com um filtro vermelho apresentaram produção de ficocianina superior a aqueles onde, apesar da densidade luminosa ser maior, foram utilizados filtros nas cores verde e azul. O grau de pureza da ficocianina obtida após o cultivo sob o filtro vermelho também foi ligeiramente superior e pode representar uma forma simples para incrementar a sua pureza.

Outro aspecto importante está relacionado com um menor consumo energético e consequentemente na redução dos custos para obtenção dos produtos de interesse, pois se fossem empregadas apenas lâmpadas ou filtros luminosos na faixa do espectro entre o laranja e o vermelho, o aproveitamento dos fótons dessa faixa do espectro é maior, tendo como consequência a obtenção de ficocianina com maior grau de pureza e em quantidade razoável.

5.1.2 A utilização de águas residuárias (efluente líquido) como meio de cultivo alternativo para a produção de biomassa de *Spirulina platensis* é possível sob determinadas condições.

Os testes realizados com o cultivo de *Spirulina platensis* em efluente primário de criadouro de suínos, ou seja, efluente sem nenhum tratamento prévio, demonstraram que mesmo diluído, esse efluente prejudica a produção de biomassa e consequentemente a obtenção de ficocianina, que foi muito reduzida. A aplicação de efluente industrial terciário diluído, coletado à

jusante de uma estação de tratamento apresentou produção de biomassa semelhante aos cultivos realizados em meio padrão (Zarrouk), porém, também foram constatadas alterações morfológicas na *Spirulina*, assim como redução na quantidade de ficocianina obtida, portanto, a carga de nutrientes presentes no efluente utilizado precisa ser equalizada e adaptada ao cultivo de *Spirulina platensis*.

5.1.3 A manipueira demonstra grande potencial para o cultivo de *Spirulina platensis*.

A produtividade obtida com os cultivos de *Spirulina platensis* consoante à adição gradual de manipueira filtrada e esterilizada foi ligeiramente inferior ($0,090 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) à obtida com o cultivo de *Chlorella vulgaris* ($0,100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$), entretanto, muito superior aos cultivos realizados com meio padrão, cuja maior produtividade da *Spirulina* foi obtida na cinética 03, sob luz natural e com valor médio de $0,050 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. A relação entre a ficocianina extraída, pela quantidade de biomassa cultivada com manipueira filtrada foi até 25% inferior à produzida em meio padrão cultivado sob luz natural, porém, cabe ressaltar o menor custo do meio de cultivo, assim como a redução do caráter poluidor da manipueira após o cultivo.

Os cultivos realizados com manipueira filtrada, não esterilizada e com um incremento de 50% na densidade luminosa, apresentaram resultados extremamente positivos, já que a produtividade da biomassa triplicou tanto para a *Spirulina* quanto para a *Chlorella*, indicando uma forte relação entre produtividade, a densidade luminosa e o meio de cultivo. Entretanto, a produtividade máxima de ficocianina foi obtida no 11º dia de cultivo e foi 35% inferior à obtida com a manipueira filtrada e esterilizada.

5.1.4 O SDFA pode ser empregado como uma segunda etapa de purificação da ficocianina

O estudo da purificação da ficocianina com solução saturada de sulfato de amônio confirmou a baixa capacidade que esse método propicia para a obtenção de ficocianina com um padrão mínimo de pureza para ser considerado produto com grau alimentício. Vale lembrar que as amostras de ficocianina com uma razão A_{620}/A_{280} maior que 0,7 são consideradas de grau

alimentício, numa escala que pode chegar até 10. Outro inconveniente é a geração excessiva de efluente carregado de sais.

Por outro lado, o emprego da purificação através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) pode incrementar o grau de pureza da ficocianina consideravelmente. Nos sistemas testados e após a análise estatística, foram identificadas as melhores condições para incrementar a recuperação ou a purificação da ficocianina. Como o objetivo do experimento era incrementar o fator de purificação da amostra de ficocianina, o sistema 10, que utilizou PEG de mais baixa massa molar, combinado com o ajuste de pH mais baixo, foi o que apresentou melhor resultado, com um fator de purificação de 2,67 para a ficocianina.

A aplicação da ficocianina purificada e diluída em amostras de alimentos (leite fermentado co probióticos) com baixo pH, demonstrou que, apesar de alguns autores relatarem a instabilidade e possível degradação do pigmento nessa condição, no período testado não houve degradação da ficocianina, favorecendo sua aplicação em alimentos com esse apelo funcional.

5.1.5 É possível criopreservar a *Spirulina platensis* por longos períodos, garantindo a sua viabilidade.

Os testes com diferentes técnicas de preservação e criopreservação possibilitaram identificar duas etapas fundamentais para garantir o sucesso na preservação da *Spirulina platensis*: a concentração da biomassa e depois a adição de DMSO como agente crioprotetor. Dentre as condições testadas após essas duas etapas, a criopreservação da cultura (testada como condição 03) foi a que garantiu a maior viabilidade ao final do período, pois garante o rápido congelamento, assim como a manutenção das células abaixo da temperatura de transformação vítrea.

Considerando a dificuldade para a determinação da viabilidade celular, a metodologia desenvolvida, aplicada e comparada com outros métodos utilizados para a contagem das células viáveis também demonstrou excelente confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para a continuidade da linha de pesquisa relacionada ao cultivo de microalgas e obtenção de ficocianina, os seguintes trabalhos são sugeridos:

- a) analisar aspectos envolvidos com a obtenção de ficocianina a partir de resíduos agroindustriais;
- b) avaliar a capacidade depurativa de microalgas como a *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* quando cultivadas em resíduos agroindustriais e de que forma elas podem reduzir os impactos ambientais;
- c) realizar novos ensaios e aprimorar os estudos sobre a aplicação da ficocianina em alimentos;
- d) testar novas técnicas de concentração e purificação de proteínas, no caso, as ficobiliproteínas;
- e) Aprimorar os estudos sobre a adaptação cromática complementar da *Spirulina platensis*, realizando testes com a aplicação de luz em comprimentos de onda mais específicos e analisando a influência na obtenção das ficobiliproteínas.

6 REFERÊNCIAS

- ANAGA, A.; ABU, G. O. A Laboratory-scale Cultivation of *Chlorella* and *Spirulina* Using Waste Effluent From a Fertilizer Company in Nigeria. *Bioresour. Technol.* 58: 93-95, 1996.
- ANDERSEN, R. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. 589 p. il. 2005.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* 264: 130–133, 2007.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da Microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. *Ciênc. Agrotec.* 32: 1551-1556, 2008.
- ANTELO, F.S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.* 41: 43–47, 2008.
- ANTENNA TECHNOLOGIES. Disponível em <<http://www.antenna.ch/projets-terrain/spiruline-programmes/>> Acesso em: fev. 2010.
- BECKER, E. W.; VENTKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. *Biomass* 4: 105-125, 1984.
- BECKER, E. W. *Microalgae — Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. Em RICHMOND, A. (ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phicology*. London: Blackwell Science. 312 – 351, 2004.
- BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25: 207–210, 2007.
- BEN-AMOTZ, A.; GILBOA, A. Cryopreservation of Marine Unicellular Algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 157-161, 1980.
- BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification - a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J. Chromatogr. B* 807: 33–38, 2004.

BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-green Alga. *J. Cell. Biol.* 58: 419-435, 1973.

BERG, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*. 5th Ed. New York: W H Freeman, 2002.

BERGMANN, B.A.; CHENGB, J.; CLASSEN, J.; STOMPA, A.-M. *In vitro* selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresour. Technol.* 73: 13-20, 2000.

BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, Á. M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 110: 436–445, 2008.

BERTOLIN, T. B. P.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. Cultivo da cianobacéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. *Ciênc. Agrotec., Lavras*, v. 29, n. 1: 118-125, 2005.

BREJC, K.; FICKNER, R.; HUBER, R.; STEINBACHER, S.; Isolation, Crystallization, Crystal Structure Analysis and Refinement of Allophycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 249: 424 – 440, 1995.

BORGHETTI, I. A., Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipuladora. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* 70: 313–321, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248–254, 1976.

BREJC, K.; FICNER, R.; HUBER, R.; Steinbacher, S. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 249: 424-440, 1995.

CAMERINI, F. V. Fixação Biológica de Dióxido de Carbono por *Spirulina (Arthrospira) platensis*. FURG. Rio Grande, 90 p., 2008.

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. *Biology*. 6th ed., Benjamin Cummings, 2001.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.* 20:221-224, 1997.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain *Pacifica*) at the air/water interface. *Colloids Surf. A.* v. 173: 181-192, 2000.

COHEN, Z. Products from microalgae. Em: RICHMOND, A. (ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC, 421 – 454, 1986.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and Nitrogen Concentrations. *Z. Naturforsch.* 59c: 55-59, 2004.

COLLA, L. M., FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* Vol.50, n.1: 161-167, 2007-a.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. 98: 1489-1493, 2007-b.

CONVERTI, A., LODI, A., DEL BORGHI, A., SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular system. *Biochem. Eng. J.* 32:13–18, 2006.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRÜGER, R. T. Modeling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 16, p. 15-18, 2000.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 18, p. 603-607, 2002.

COSTA J. A., RADMANN E. M., CERQUEIRA V. S., SANTOS G. C., CALHEIROS M.N. Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições. *Alim. Nutr., Araraquara*. V.17, n.4: 429-436, 2006.

CRAIG, I. W.; CARR, N. G. C-Phycocyanin and Allophycocyanin in Two Species of Blue-Green Algae. *Biochem. J.* 106: 361, 1968.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer. *Water Res.* 38: 222–4246, 2004.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DIC LIFETEC CO. LTD. Nutritional elements contained in DIC *Spirulina*. Disponível em: <dltspl.co.jp/business/en/Spirulina/elements.html> . Acesso em: Nov. 2009.

DICIONÁRIO LIVRE DE GEOCIÊNCIAS. Estromatólitos. Disponível em <<http://www.dicionario.pro.br/dicionario/index.php/Estromat%C3%B3lito>> Acesso em: Jan. 2010.

DUFOSSÉ, L.; GALAUPA, P.; YARONB, A.; ARADB, S. M.; BLANCC, P.; RAVISHANKARD, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Tech.* 16: 389–406, 2005.

EMBRAPA. Uso de Manipueira como Adubo Orgânico para o Cultivo da Mandioca. Disponível em <<http://www.cpatu.embrapa.br/servicos/consultorias/uso-da-manipueira-como-adubo-organico-para-o-cultivo-da-mandioca>> Acesso em mai, 2011.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culuring. *Biotechnol. Lett.* 30: 1525 – 1536, 2008-a.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:1–14, 2008-b.

ESTRADA, J. P. N., BESCÓS P. B., VILLAR DEL FRESNO, A. M., Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56:497–500, 2001.

FLETCHER, M. 1979. Microbial ecology: a conceptual approach. J.M. and Poole, N.J., pp 92-114. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

FOGG, G.E., THAKE, B. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. 3° ed. The University of Winsconsin Press. England. 269 p. il, 1987.

- GARRIDO, I.M. Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresour. Technol.* 99: 3949 – 3964, 2008.
- GLAZER, A. N. Phycobilisomes: structures and dynamics. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 173 – 198, 1982.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. *Algae*. Prentice Hall: Upper Saddle River, N.J. 640 p., 2000.
- GRAVERHOLT, O. S.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 69–75, 2007.
- GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* 57(3): 725-749, 1993.
- GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Taylor e Francis Group. 301 p., 2006.
- GUPTA, A., SAINIS, J. K., Isolation of C-phycocyanin from *Synechococcus sp.*, (*Anacystis nidulans* BD1). *J. Appl. Phycol.* Online, 2009.
- HASH BIOTEC LABS. Organic Spirulina. Disponível em: <http://www.hashbiotech.com/hashbiotech/ps_spirulina.aspx>. Acesso em: Dez. 2009.
- HENDRICKX, L., WEVER, H., HERMANS, V., MASTROLEO, F., MORIN, N., WILMOTTE, A., JANSSEN, P., MERGEAY, M. Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative): Reinventing and compartmentalizing the Earth's food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions. *Res. Microbiol.* 157: 77–86, 2006.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205–229, 2003.
- JAPAN FOOD RESEARCH LABORATORIES. Certificate of Analysis. *Spirulina* Powder HDM (T454). 04 jul 2007.
- KEHOE, D. M.; Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. *PNAS* 107: 9029–9030, 2010.

LEE, R. E. Phycology. 2nd ed. Cambridge University Press. EUA. 645 p. 1989.

LEE, YK. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. J. Appl. Phycol. 13: 307–315, 2001.

LUND, H. C., LUND, J.WG. Freshwater Algae – Their microscopic world explored. Biopress Ltd. England. 360 p. il., 1998.

MADHYASTHA, H. K.; SIVASHANKARIA, S.; VATSALAA, T. M. C-phycocyanin from *Spirulina fusciformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity Biochem. Eng. J.. 43: 221–224, 2009.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. Cryobiology. 8: 173-183, 1971.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA S. T.; ANTOVA R. E.; BUSHEVA M. CH. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. J. of Biotechnol. 102: 55-59, 2003.

MÍRELES, T. H., BENAVIDES, J., PALOMARES, M. R., Proceso para purificación del colorante proteico B-Ficoeritrina producido por *Porphyridium cruentum*. Rev. Mex. Ing. Quim. 5: 131-143, 2006.

MONTEIRO, M. P. C.; LUCHESE, R. H.; ABSHER. T. M., Effect of Three Different Types of Culture Conditions on *Spirulina maxima* Growth. Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.2: 369-373, 2010.

MORAIS, M. G. ; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V., Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. Aquaculture 294: 60–64, 2009.

MORIST, A., MONTESINOS, J. L., CUSIDÓ, J.A., GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. Process Biochem. 37: 535 – 547, 2001.

MORRIS, G. J. Cryopreservation: An Introduction to Cryopreservation in Culture Collections. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology, 1981.

MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, A. A. V., HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V; BERTOLIN, E. B.; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* Em batelada alimentada. Ciênc. Agrotec., Lavras, v. 29, n. 6, p.: 1132-1138,, 2005.

MUÑOZ, R., GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. Water Res. 40: 2799 – 2815, 2006.

NASU, E. G. C. Composição Química da Manipueira e sua Potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO NO OESTE DO PARANÁ. Dissertação de mestrado, 2008.

NOAA-OE. Ocean Zones. < <http://oceanexplorer.noaa.gov>>. Acesso em mai, 2011.

OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., ANGULO-GUERRERO, O.; HERNNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. Bioresour. Technol. 77: 19-24, 2001.

OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., MERCADO, G., PÉREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. J. Appl. Phycol. 15: 249–257, 2003.

OLIVEIRA, M. A. C. L., MONTEIRO, M. P. C., ROBBS, P. G., LEITE, S. G. F., Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. Aquacult. Int. 7: 261–275, 1999.

PÁDULA, M., BOITEUX, S., FELZENSZWALB, I., MENEZES, S. Photodynamic action of phycocyanin: damage and repair. J. Photochem Photobiol., B: Biology 32: 19 – 26, 1996.

PADYANA, A. K.; BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M.; RAJASHANKAR, K. R. AND RAMAKUMARCRYSTAL, Structure of a Light-Harvesting Protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 282: 893–898, 2001.

PATEL, A.; MISHRA, S., PAWAR, R.; GHOSH, P.K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. Protein Expression and Purif. 40: 248–255, 2005.

PATIL G, CHETHANA S, SRIDEVI AS, RAGHAVARAO KSMS. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. J. Chromatogr. A 1127: 76–81, 2006.

PIÑERO, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56 (2001) 497–500.

PROZYME. C-Phycocyanin (Specifications). Disponível em: <<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Nov. 2010-a.

PROZYME. Allophycocyanin (Specifications). Disponível em: <<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Nov. 2010-b

PROZYME. R-Phycocerytrin (Specifications). Disponível em: <<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Nov. 2010-c.

PUSHPARAJ, B.; PELOSI, E.; TREDICI MR. PINZANI, E, MATERASSI. An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 9:113–119, 1997.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, v 92, p. 133-141, 2004.

RAOOF, B., KAUSHIK, B. D., PRASANNA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenerg.* 30: 537 – 542, 2006.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz. J. Chem. Eng.* 23: 23-28, 2006.

REINEHR, C. O. Estudo do cultivo semicontínuo de microalga *Spirulina platensis* utilizando água da lagoa Mangueira. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2001.

RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. Em: RICHMOND, A. (ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC, 1990. P. 69-100.

ROBBINS, S. P., Administração: Mudanças e Perspectivas / Stephen Paul Robbins; <Tradução de Cid Knipel Moreira>, São Paulo: Saraiva, 2000.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D., GONZÁLEZ; R., LEDON, N. GARCÍA. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm. res.* 47: 36–41, 1998.

RYAN, C. Cultivating Clean Energy: The Promisse of Algae Biofuels. Terrapin Bright Green,,LLC e NRDC. 2009.

SAG. Cyanidium Medium (=Acid). Medium Recipe. Version 03.2007

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina sp*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.* 34: 795–801, 1999.

SCHELDEMAN, P.; BAURAIN, D.; BOUHY, R.; SCOTT, M.; MUËHLING, M.; WHITTON, B. A.; BELAY, A.; WILMOTTE, A. *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 213-222., 1999.

SCHMIDT, R. A.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic High Cell-Density Fed-Batch Cultures of the Phycocyanin-Producing Red Alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnol. Bioeng.* 90: 1, 2005.

SILVA, L. A. Estudo do Processo Biotecnológico de Produção, Extração e Recuperação do Pigmento Ficocianina da *Spirulina platensis*. UFPR. Curitiba, 90 p., 2008.

SILVA, L. H. M; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 6, 1345-1351, 2006.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J.; Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresour. Technol.* 98: 1629–1634, 2007.

SINGH, N., K.; PARMAR, A.; MADAMWAR, D. Optimization of medium components for increased production of C-phycocyanin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. *Bioresour. Technol.* 100: 1663–1669, 2009.

SLOTH, J.K.; Wiebe, M.G.; ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38:168–175, 2006.

SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochem.* 41: 2017–2023, 2006.

SOUZA, F., T.; MARGARITES, A., C.; COLLA, L., M.; COSTA, J., A., V.; BERTOLIN, T.E. Evaluation of the antioxidant potential of phycocyanin in soil and olive oils. *Alim. Nutr. Araraquara*, v.17, n.3: 275-279, 2006.

SPILLER, S., DENBEAUX, G., JONES, G., PEARSON, A. L., Fine structure of Cyanobacteria, *Spirulina platensis* and *Spirulina subsalsa*, as viewed by x-ray microscope, XM-1, beamline 6.1.2. Department of Biology, Mills College, USA, 2010.

SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 101, N° 2: 87-96, 2006.

STEGER, C. The Promise of Algae Biofuels - a new NRDC report. Natural Resources Defense Council. Disponível em < http://switchboard.nrdc.org/blogs/csteger/the_promise_of_algae_biofuels.html>. Acesso em dez. 2009.

SUN, L.; WANG B, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. of Biotechnol.* 121: 563–569, 2006.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresour. Technol.* 101: 5892-5896, 2010.

The Kehoe Laboratory. Uncovering Mechanisms Regulating Red-Green Light Acclimation. Disponível em: < <http://www.bio.indiana.edu/~kehoelab/research.html>>. Department of Biology at Indiana University Bloomington. Acesso em: dez. 2009.

ULPGC. Apostila de Maricultura Vegetal – Curso 2002-2003. Disponível em: < http://www.ulpgc.es/descargadirecta.php?codigo_archivo=4005>. Acesso em: dez. 2009.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MEESSCHAERT, B.; MUYLEAERT, K., Flocculation of microalgae using cationic starch. *J Appl Phycol*, 22: 525–530, 2010.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthorspira)*: Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. 264 p., London, 1997.

VONSHAK, A. RICHMOND, A. Mass Production of the Blue-green Algae *Spirulina*: an Overview *Biomass*, 15: 233-247, 1998.

WANG, C.; FUB, C.; LIU, Y. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 37: 21–25, 2007.

WEN, Z. e JOHNSON, M. B. Microalgae as a Feedstock for Biofuel Production. Virginia Cooperative Extension, Virginia Tech, and Virginia State University. EUA, 2008.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.

ZHANG, X.-W.; ZHANG, Y.-M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 477-481, 1999-a.

ZHANG Y-M, CHEN F. A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnol Tech* 13:601–603, 1999-b